

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 8 月 8 日 (08.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/061119 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/26, 1/37, C12N 15/09, G01N 33/68, 33/72 [JP/JP]; 〒599-8233 大阪府 堺市 大野芝町 23-4-93 Osaka (JP). 今村 茂行 (IMAMURA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒410-2321 静岡県 田方郡 大仁町 三福 236-3 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00721
- (22) 国際出願日: 2002 年 1 月 30 日 (30.01.2002) (74) 代理人: 藤野 清也, 外 (FUJINO, Seiya et al.); 〒160-0004 東京都 新宿区 四谷 1 丁目 2 番 1 号 三浜ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2001-22953 2001 年 1 月 31 日 (31.01.2001) JP  
特願 2001-39796 2001 年 2 月 16 日 (16.02.2001) JP  
特願 2001-240002 2001 年 8 月 8 日 (08.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭化成株式会社 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒530-8205 大阪府 大阪市 北区 堂島 浜 1 丁目 2 番 6 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高妻 卓司 (KOUZUMA, Takuji) [JP/JP]; 〒411-0025 静岡県 三島市 壱町 田 273-8 メゾン つつじヶ丘 1-202 Shizuoka (JP). 芳陵 一生 (YOSHIOKA, Issei) [JP/JP]; 〒410-2321 静岡県 田方郡 大仁町 377-6-701 Shizuoka (JP). 荒井 基夫 (ARAI, Motoo) [JP/JP]; 〒590-0138 大阪府 堺市 鴨谷台 3-2-20-204 Osaka (JP). 炭谷 順一 (SUMITANI, Junichi)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア 特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ 特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITIONS FOR ASSAYING GLYCOPROTEIN

(54) 発明の名称: 糖化蛋白質測定用組成物

(57) Abstract: Compositions for accurately assaying a glycoprotein by: 1) avoiding effects of globulin and ascorbic acid components; 2) stabilizing proteases and at least enzymes acting on glycoamino acids; 3) accurately assaying albumin; and 4) assaying glycoalbumin while avoiding the effects of glycohemoglobin, and an assay method are provided. Thus, the contents of a glycoprotein and glycoalbumin can be more accurately determined.

(57) 要約:

本発明は、1) グロブリン成分及びアスコルビン酸の影響回避、2) プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化、3) 正確にアルブミンを測定、4) 糖化ヘモグロビンの影響回避を行うことに糖化アルブミンを測定することにより、糖化蛋白質を正確に測定するための組成物、測定方法を提供する。本発明により、より正確に糖化蛋白質及び糖化アルブミン割合を測定することが可能になった。

WO 02/061119 A1

## 明細書

## 糖化蛋白質測定用組成物

## [技術分野]

本発明は、糖化蛋白質を測定するための組成物及び糖化蛋白質の測定方法に関する。本発明における糖化蛋白質の測定用組成物及び測定方法は臨床検査に用いられ、正確に糖化蛋白質を測定することができる。

## [背景技術]

糖尿病の診断及び管理を行う上で糖化蛋白質の測定は非常に重要であり、過去約1～2ヶ月の平均血糖値を反映する糖化ヘモグロビン(GHb)、過去約2週間の平均血糖値を反映する糖化アルブミン(GA)、及び血清中の還元能を示す糖化蛋白質の総称であるフルクトサミン(FRA)等が日常的に測定されている。GHbはヘモグロビンのβ鎖N末端バリンのαアミノ基が、GA、FRAはアルブミン、血清蛋白質のリジン残基のεアミノ基がそれぞれ糖化されている。

精度が高く、簡便かつ安価な糖化蛋白質の測定法としては酵素法があげられる。その例としては特開平6-46846号公報、特開平5-192193号公報、特開平2-195900号公報、特開平2-195899号公報、W098/48043号公報、W097/13872号公報等がある。

しかしながら、真に糖化蛋白質を正確に測定する組成物を提供するには、1) グロブリン成分及びアスコルビン酸の影響回避、2) プロテアーゼ、少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化が必須であり、さらに糖化蛋白質が糖化アルブミンである場合には、3) 正確にアルブミンを測定する方法、4) 糖化ヘモグロビンの影響回避を行うことも重要である。

## 1) グロブリン成分及びアスコルビン酸の影響回避に関する従来技術

糖尿病患者ではグロブリン蛋白質量が増加しFRAの値に影響を及ぼすことが知られている[Rodrigues S et al, Clin Chem. 35:134-138(1989)]。そこで本発明者らはプロテアーゼ反応液にある種の金属イオンやプロテインA若しくはGを添加することによりプロテアーゼのグロブリン成分への作用を選択的に阻害する方法(特願平11-231259)を開発してきた。この発明ではグロブリン成分の影響を

受けることなく糖化蛋白質を測定することが出来るが、そこで用いられるグロブリン選択的なプロテアーゼ阻害剤としては、金属、プロテインA、Gが記載されている。しかし、ここで示されている特定の金属のうち、効果が強い金属は重金属であり、環境安全上の問題がないとは言えず、また効果の弱い金属は他の試薬成分（他の組成物）と組み合わせると試薬溶液に濁りが生じることがあった。またプロテインA、Gは非常に高価である。

さらに、血液中のグロブリンを選択的に吸着する方法としてステロイド骨格を持ったリガンドをビニル系の共重合体に導入しクロマトグラフィーの原理を用いて血液中の内毒素やグロブリンを吸着する血液処理剤（特開昭61-94663号公報）が知られている。しかし特開昭61-94663号公報の実施例表1の検討結果ではグロブリンのうち吸着が確認できているのは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ グロブリンだけでありグロブリン成分の70%以上を占める $\gamma$ グロブリンには吸着能を示していない。またたとえ $\gamma$ グロブリンに吸着能を示したとしてもプロテアーゼの $\gamma$ グロブリンへの作用をどの程度阻害できるかは予測不可能である。

アスコルビン酸は近年補助食品として大量に摂取されるケースが増えており、高濃度のアスコルビン酸を含有する臨床検体が増加している。アスコルビン酸は、その強力な還元力により臨床検査を行う上で様々な影響を引き起こす。

検体中のアスコルビン酸の影響を回避する方法としては化学的な方法やアスコルビン酸オキシダーゼを用いた酵素的な方法を用いて検体中のアスコルビン酸を消去する方法が知られている。プロテアーゼを用いて糖化蛋白質を断片化し、次いで少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて生じた糖化アミノ酸を測定する場合、プロテアーゼ反応と同時にアスコルビン酸オキシダーゼ（ASOx）を作用させ、前もってアスコルビン酸を消去する方法が発色系への影響が小さく好ましい。

プロテアーゼの存在下、被検液中のアスコルビン酸をASOxを用いて消去した例としては、被検液に、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸（HEPES）緩衝液pH8.0の条件で作用させた例（臨床化学 27：99-106, 1998）があり、冷蔵保存で2週間はアスコルビン酸の処理能に変化は無いと記述されている。

しかし、本発明者らの検討ではHEPES緩衝液pH8.0、プロテアーゼ及びASOxが共存した場合のアスコルビン酸処理能は37℃-1日若しくは10℃-2週間の保存でほと

んど消失した。

2) プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化に関する従来の技術

糖化蛋白質の臨床的な測定には他の分野、例えば食品分野等では考えられない程高濃度のプロテアーゼが水溶液の状態で使用される。プロテアーゼは水溶液中では自己消化がおこることが知られており、この様な高濃度の水溶液中で安定に存在するとは考えにくい。よってこれまでの糖化蛋白測定用組成物に用いられるプロテアーゼは凍結乾燥品で供給されている。

糖化蛋白測定用組成物、測定方法に関し液状で長期に保存出来るレベルまでプロテアーゼの安定化を行った例はない。同様に糖化蛋白測定用組成物、測定方法に関し液状で長期に保存出来るレベルまで少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化を行った例はない。

3) 正確にアルブミンを測定する方法に関する従来の技術

アルブミン測定法には抗アルブミン抗体を用いた免疫法、ブロモクレゾールグリーン (BCG)、ブロモクレゾールパープル (BCP) 等を用いた色素法等がある。操作が簡便でかつコストが安いことから、日常検査では色素法が広く用いられているが、BCG法はグロブリン成分に作用が確認されておりアルブミンに対する特異性が低いという欠点がある。

一方BCP法はアルブミンに対する特異性は高いものの、共存物質の影響を受けやすく、またSH化合物の影響を受けることからアルブミンの酸化還元状態により値が変化するという問題があった。この問題を解決する方法としては蛋白質変性剤及び／またはSH試薬の存在下BCPの反応を行った例 (特開平10-232233号公報) が知られている。しかし、GAと非糖化アルブミン(NGA)に対するBCP反応性の検討を行った例はこれまでなかった。

4) 糖化ヘモグロビンの影響回避に関する従来の技術

前述のようにGAはアルブミンの $\epsilon$ アミノ基が糖化されており、一方GHbはヘモグロビン中の $\beta$ 鎖N末端バリンの $\alpha$ アミノ基が糖化されている。よってGAを測定対象とする場合には $\epsilon$ アミノ基が糖化されたアミノ酸のみを測定できれば好ましい。

これまで $\epsilon$ アミノ基に高い特異性を示し、糖化バリンに作用しない酵素はいくつか知られているが (特開平11-243950号公報)、実用化できるほど安いコスト

で供給されているものはない。このうち特にフザリウム・オキシスポルム由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FOD) は反応性が高く有用であり、発明者らは該FODの遺伝子を分離し報告している (特開平10-201473号公報)。ただし本遺伝子を用いた製造法は生産性が高く、低いコストでFODが生産できるものの $\alpha$ アミノ基が糖化されている糖化バリンへの反応性が確認されており、特異性の点で満足いくものではなかった。

#### [発明の開示]

本発明の目的は、糖化蛋白質を正確に測定するにあたり、1) グロブリン成分及びアスコルビン酸の影響回避した、2) プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を安定化した組成物、安定化方法を提供することにある、さらに糖化蛋白質が糖化アルブミンである場合には、3) 正確にアルブミンを測定する、4) 糖化ヘモグロビンの影響回避を行う組成物、影響回避方法を提供することにある。

糖化蛋白質を正確に測定するにあたり、1) グロブリン成分及びアスコルビン酸の影響回避、2) プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化が正確な糖化蛋白質の測定には必須であり、さらに糖化蛋白質が糖化アルブミンである場合には、3) アルブミンの正確な測定、4) 糖化ヘモグロビンの影響回避が必須である。

##### 1) グロブリン成分及びアスコルビン酸の影響回避

本発明者らは鋭意検討の結果、プロテアーゼ反応液にデオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、コール酸アミド、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤、コンカナバリンA、オクチルグルコシドまたはベタインから選択される1種以上を添加することによりプロテアーゼのグロブリン成分への作用を選択的に阻害できること、またこの反応液に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を直接作用させても酵素作用が阻害されることなく、再現性良く、精度良くかつ簡便に糖化蛋白質が測定できることを見出した。しかも、これらの化合物は、経済的に有利で、かつ従来の技術を用いたときに比べて環境安全上問題がなく、検体と混合された場合に濁りを生じることもないものである。

またアスコルビン酸の除去にはASOxを用いると効率的であるがプロテアーゼが

大量に存在する反応液中でASO<sub>x</sub>が安定に存在するとは通常考えにくい。実際本発明者らの検討結果ではプロテアーゼの種類やプロテアーゼ阻害剤及びASO<sub>x</sub>の種類等の検討ではプロテアーゼが大量に存在する反応液中でASO<sub>x</sub>を安定に存在させる条件は見つからなかった。

ところが本発明者らは鋭意検討の結果、意外にも緩衝液の種類によってASO<sub>x</sub>の安定性が飛躍的に向上することを見出した。

## 2) プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化

糖化蛋白質の臨床的な測定には前述のように高濃度のプロテアーゼが水溶液の状態で使用され、基本的にプロテアーゼ自体が不安定になる。ところが、本発明者らは鋭意検討の結果、ジメチルスルホオキシド、アルコール、水溶性カルシウム塩、食塩、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤を添加することにより、プロテアーゼの安定性が飛躍的に向上し、液状かつ高濃度の条件でも長期間保存が可能であることを見出した。

また少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素は液状での37℃-4日保存で活性が約1割に低下する酵素であり、安定な酵素とは言い難かった。しかしながら本発明者らは鋭意検討の結果、少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素に糖アルコール、スクロース、水溶性マグネシウム塩、水溶性カルシウム塩、硫安、アミノ酸、ザルコシンより選ばれる安定化剤を添加することにより液状、37℃-4日保存にて殆ど活性低下が見られない程の驚くべき安定化効果が得られることを見出した。

さらにプロテアーゼは至適pH付近では強い蛋白質分解活性を示すが、同時に自己消化反応も進行し特に液状での保存が困難になる。ところが本発明者らは鋭意検討の結果、第1試薬をプロテアーゼ作用に適した条件にし、第2試薬にプロテアーゼを液状でも安定な条件で処方することにより、測定時の条件には作用されずにプロテアーゼを安定に保存できること、また意外にも、前処理反応に使用する酵素を第2試薬に処方しても測定には影響を与えず正確な測定が可能であることを見出した。加えて第1試薬に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を処方することにより、試料中に存在する糖化アミノ酸を予め消去し、選択的に糖化蛋白質を測定することが可能であった。

## 3) 正確にアルブミンを測定する方法

本発明者らの検討により意外なことにBCPの反応性がGAとNGAで異なり、NGAが大量に混入すると値が負の影響を受けることが判明した。そこで本発明者らは鋭

意検討の結果、アルブミン測定の前、若しくは同時に蛋白質変性剤及び／又はS－S結合を有する化合物にて試料を処理することにより良好にNGAを大量に含むアルブミンを正確に測定できることを見出した。

#### 4) 糖化ヘモグロビンの影響回避

本発明者らは、上記問題点に関し鋭意研究の結果、フザリウム・オキシスポルムIFO-9972株由来FODの遺伝子を改変して、変異FODを作成し、その性状を測定することによってN末端より372番目のリジンを他のアミノ酸に置換することによって基質特異性が顕著に変化することを見出し、糖化バリリンへの反応性が著しく低く、ほぼ糖化リジンに特異的に作用する改変FODを複数作成した。

本変異FODは、上記の知見に基づいてなされたもので、FODについて配列表配列番号1のアミノ酸配列372番のリジンを別のアミノ酸に置換することにより糖化バリリン反応性が消失した変異型FODである。配列表配列番号1のアミノ酸配列372番のリジンがトリプトファン、メチオニンまたはバリリンに置換された請求項1記載の変異型FODである。

最後に、本発明者らはこれらの発明を総合して正確に糖化蛋白質を測定する組成物、測定方法を完成するに至った。

以下、この発明の構成及び好ましい形態について更に詳しく説明する。

本発明に使用しうるプロテアーゼは、被検液に含まれる糖化蛋白質に有効に作用し、かつ当該蛋白質由来の糖化アミノ酸及び／若しくは糖化ペプチドを有効に生成するものであればいかなるものを用いても良く、例えば動物、植物、バチルス(Bacillus)属、アスペルギルス(Aspergillus)、リゾパス(Rhizopus)、ペニシリウム(Penicillium)、ストレプトマイセス(Streptomyces)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)、クロストリジウム(Clostridium)、リソバクター(Lysobacter)、グリフォラ(Glufila)、酵母(Yeast)、トリチラチウム(Tritirachium)、サーマス(Thermus)、シュードモナス(Pseudomonas)、アクロモバクター(Achromobacter)等の微生物由来のプロテアーゼ等が挙げられる。

また測定対象である糖化蛋白質がGAある場合にはバチルス属及びストレプトマイセス属の微生物由来プロテアーゼがヒトアルブミン (A1b) に対する作用が大きい為より好まし。また測定対象である糖化蛋白質がGHbである場合にはバチルス属、アスペルギルス属、ストレプトマイセス属、トリチラチウム属由来のプロテアーゼがヒトヘモグロビン (Hb) に対する作用が大きい為により好ましい。

本発明に用いることの出来るプロテアーゼの活性測定法を下記に示す。

<<プロテアーゼの活性測定方法>>

下記の測定条件で30℃、1 分間に1  $\mu$ gのチロシンに相当する呈色を示すプロテアーゼ活性度を1PU (proteolytic Unit) と表示する。

<基質> 0.6% ミルクカゼイン (メルク社製)

<酵素溶液> 10PU~20PU に希釈

<酵素希釈溶液> 20mM 酢酸緩衝液 pH 7.5

1mM 酢酸カルシウム

100mM 塩化ナトリウム

<反応停止液> 0.11M トリクロル酢酸

0.22M 酢酸ナトリウム

0.33M 酢酸

<操作>

プロテアーゼ溶液を10~20PU/mlになるように酵素希釈溶液にて溶解し、この液1ml を試験管に取り30℃に加温する。あらかじめ30℃に加温しておいた基質溶液5ml を加え正確に10分後反応停止液5ml を添加し反応を停止する。そのまま30℃、30分加温を続け沈殿を凝集させ、東洋ろ紙N0.131(9cm) で濾過を行い、濾液を得る。ブランク測定はプロテアーゼ溶液1ml を試験管に取り30℃に加温し、まず反応停止液5ml を添加し続いて基質溶液5ml を添加後同様に凝集、濾過を行う。濾液2ml を0.55M 炭酸ナトリウム溶液5ml、3 倍希釈フォリン試薬1ml を加え30℃、30分反応後660nm の吸光度を測定する。酵素作用を行った吸光度からブランク測定の吸光度を差し引いた吸光度変化を求め、別に作成した作用標準曲線より酵素活性を求める。

<標準作用曲線作成法>

約50PU/ml に調整した酵素溶液を希釈し2~50PU/ml の一連の希釈倍率を持った酵素溶液を作成し上記操作を行い、得られた吸光度変化を縦軸に希釈倍数を横軸にプロットする。一方L-チロシンを0.2N塩酸に0.01% の濃度に溶解しその1ml に0.2N塩酸10ml加えたものを標準チロシン溶液とする(チロシン濃度9.09  $\mu$ g / ml)。標準チロシン溶液2ml と0.2N塩酸2ml についてそれぞれ上記測定操作を行い、得られた吸光度変化がチロシン18.2  $\mu$ gに相当する。この吸光度変化を前記グラフ上にとり、その点から横軸に垂線を下ろし横軸との交点が10PU/ml に相当



する。

また、これらのプロテアーゼの使用濃度としては、目的とする蛋白質を一定の時間で効率よく切断できる濃度であれば良く、例えば通常1~100000PU/ml、好ましくは10~10000PU/mlの濃度で用いればよい。

本発明に使用しうる少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素としては、前記プロテアーゼの作用により、被検液に含まれる糖化蛋白質から生成される糖化アミノ酸若しくは糖化ペプチドに有効に作用し、実質的に糖化蛋白質が測定できる酵素であれば如何なるものを用いても良いが、 $\alpha$ アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素、 $\epsilon$ アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素等が挙げられる。

$\epsilon$ アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の例としては、ギベレラ (*Gibberella*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、フサリウム (*Fusarium*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属又はデバリオマイゼス (*Debaryomyces*) 属由来のFOD等が挙げられる。

$\alpha$ アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の例としては、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 由来の酵素が挙げられる。

さらに、プロテアーゼと共存させた状態でも十分な活性を有し、かつ安価に製造可能な酵素の例としては、遺伝子組み替え型ケトアミンオキシダーゼ (R-FOD ; 旭化成社製) および加えて糖化バリン反応性を著しく低下させた変異型FOD (R-FOD-II ; 旭化成社製) が挙げられる。

R-FOD-IIのもととなるフザリウム・オキシスポルムIFO-9972株由来のFOD蛋白質をコードするDNAは、フザリウム・オキシスポルムIFO-9972株から常法により染色体DNAを抽出し、PCR法やハイブリダイゼーション法などで分離して得られる。

得られた該FOD遺伝子への変異の導入は、DNAに直接変異を加えるならPCR法を応用してもよいし部位特異的変異法を使用してもよい。また偶発変異によるならば、DNA修復能力の低下した大腸菌宿主を使用しても良いし、あるいはDNA変異源を添加した培地でFOD遺伝子を導入した宿主生物を培養することもできる。

かくして得られた変異FOD遺伝子を適当な宿主ーベクター系を用いて宿主微生物に導入し、発現ベクターのマーカート、FODの活性発現若しくはDNAプローブを

指標としてスクリーニングを行い、FOD遺伝子を含有する組換えDNAプラスミドを保持する微生物を分離し、該遺伝子組換え微生物を培養し、該培養菌体から組換え蛋白を抽出精製することで変異FODを得ることができる。

変異FODを得るためには、具体的には以下のように行えばよいが、その操作法のうち常法とされるものは、例えばマニアティスらの方法 (Maniatis, T., et al. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory 1982, 1989) や、市販の各種酵素、キット類に添付された手順に従えば実施できるものである。

分離したFOD遺伝子に変異を導入するにはマンガンイオン添加条件下に於けるTaqポリメラーゼを始めとする3' → 5' 修復能欠損型ポリメラーゼを使用したPCR法や、DNA修復能を欠損した大腸菌宿主にFOD遺伝子を導入しジアニシジンなどの変異源を添加した培地で培養することにより遺伝子変異を誘発し、作成した変異候補株群より目的の基質特異性を獲得した変異体を分離すればよい。

上述の方法によって導入されたFODの変異は、ジデオキシ法 (Sanger, F. (1981) Science, 214, 1205-1210) で変異を導入した遺伝子の塩基配列を確認することにより決定できる。

また一度変異が決定した後はゾラーらの方法 (Zoller, M. J. and Smith, M. (1983) Methods in Enzymology, 154, 367) による部位特異変異法で特定の変異を導入することもできる。

変異FODを構成するポリペプチドのアミノ酸配列の変異は、変異遺伝子の塩基配列より決定できる。以上の方法で得られた変異FODは変異FOD遺伝子を適当な宿主-ベクター系に組み込むことにより組換え体として生産できる。

変異FOD遺伝子を組み込むベクターとしては、宿主微生物体内で自律的に増殖しうるファージ又はプラスミドから遺伝子組み換え用として構築されたものが適しており、ファージベクターとしては、例えば、E. coliに属する微生物を宿主微生物とする場合には $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ C、 $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ Bなどが使用できる。また、プラスミドベクターとしては、例えば、E. coliを宿主微生物とする場合にはプラスミドpBR322、pBR325、pACYC184、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pIN I、Blue scriptKS+、枯草菌を宿主とする場合にはpUB110、pKH300PLK、放線菌を宿主とする場合にはpIJ680、pIJ702、酵母特にサッカロマイセス・セルビシエ (Saccharomyces cerevisiae) を宿主とする場合にはYrp7、pYC1、Yep13などが使用できる。

このようなベクターに変異FOD遺伝子を組み込むには、双方を同じ末端を生成

する適当な制限酵素で切断し、変異FOD遺伝子を含むDNAフラグメントとベクター断片とを、DNAリガーゼ酵素により常法に従って結合させればよい。

変異FOD遺伝子を結合したベクターを移入する宿主微生物としては、組み換えDNAが安定かつ自律的に増殖可能であればよく、例えば宿主微生物が*E. coli*に属する微生物の場合、*E. coli* DH1、*E. coli* JM109、*E. coli* W3110、*E. coli* C600などが利用できる。また、微生物宿主が枯草菌に属する微生物の場合、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) ISW1214など、放線菌に属する微生物の場合、ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) TK24など、サッカロマイセス・セルビシエに属する微生物の場合、サッカロマイセス・セルビシエ IN VSC1などが使用できる。

宿主微生物に組み換えDNAを移入する方法としては、例えば、宿主微生物が*E. coli*やサッカロマイセス・セルビシエ、ストレプトマイセス・リビダンスに属する微生物の場合には、常法に従ってコンピテントセル化した宿主菌株に組み換えDNAの移入を行えばよく、菌株によっては電気穿孔法を使用してもよい。

変異FODを生産するためには、変異FOD遺伝子を導入した宿主を適切な培地で培養し、培養した菌体を集菌後、適当な緩衝液中にて超音波破碎やリゾチーム処理などにより菌体を破壊し、菌体抽出液を調製すればよい。また、シグナル配列を付加することによる分泌発現により、培養溶液中に変異FODを蓄積させても良い。

かようにして生産された変異FODは、通常のスピン沈殿、ゲル濾過、カラム精製などによって分離精製され、酵素標品として供給される。

上記の遺伝子操作に一般的に使用される量的関係は、供与微生物からのDNA及びベクターDNAを0.1～10  $\mu$ gに対し、制限酵素を約1～10U、リガーゼ約300U、その他の酵素約1～10U、程度が例示される。

変異FOD遺伝子を含み、変異FODを産生し得る形質転換微生物の具体的な例示としては、*エシェリヒア・コリ*に属する微生物を宿主微生物とし、その内部に変異FOD遺伝子を含むプラスミドpcmFOD3を保有する形質転換微生物、*エシェリヒア・コリ* JM109・pcmFOD3 (FERM BP-7847)、およびpcmFOD4を保有する形質転換微生物、*エシェリヒア・コリ* JM109・pcmFOD4、およびpcmFOD5を保有する形質転換微生物、*エシェリヒア・コリ* JM109・pcmFOD5 (FERM BP-7848) が挙げられる。これらの構造を図7に示した。

なお、前記*エシェリヒア・コリ* JM109・pcmFOD3及び*エシェリヒア・コリ* JM109・p

cmFOD5は、共に平成13年1月16日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託され、それぞれ受託番号FERM BP-7847及びFERM BP-7848を付与された。

形質転換微生物により該変異FODを製造するに当っては、該形質転換微生物を栄養培地で培養して菌体内又は培養液中に該変異FODを産生せしめ、培養終了後、得られた培養物を濾過又は遠心分離などの手段により菌体を採集し、次いでこの菌体を機械的方法又はリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、又、必要に応じてEDTA及び／又は適当な界面活性剤などを添加して該変異FODの水溶液を濃縮するか、又は濃縮する事なく硫酸分画、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等の吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより処理して、純度のよい該変異FODを得ることができる。

形質転換微生物の培養条件はその栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は、液体培養で行うが、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用されうる。

炭素源としては、資化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、サッカロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物などが使用される。

その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は微生物が発育し、変異FODを生産する範囲で適宜変更し得るが、*E. coli*の場合、好ましくは20～42℃程度である。培養条件は、条件によって多少異なるが、変異FODが最高終了に達する時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、*E. coli*の場合、通常は12～48時間程度である。培地pHは菌が発育し、変異FODを生産する範囲で適宜変更し得るが、*E. coli*の場合、好ましくはpH 6～8程度である。

培養物中の変異FODは、菌体を含む培養液そのままを採取し、利用することもできるが、一般には常法に従って、変異FODが培養液中に存在する場合には、濾過、遠心分離などにより変異FOD含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用さ

れる。変異FODが菌体内に存在する場合には、得られた培養物を濾過又は遠心分離などの手段により、菌体を採取し、次いでこの菌体を必要に応じて機械的方法又はリゾチームなどの酵素的で破壊し、またEDTAなどのキレート剤及び／又は界面活性剤を添加して変異FODを可溶化し水溶液として分離採取する。

この様にして得られた変異FOD含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に、硫酸、硫酸ナトリウムなどの塩析処理などによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。

次いでこの沈澱物を、水に溶解し、半透膜にて透析せしめて、より低分子量の不純物を除去することができる。また、吸着剤あるいはゲル濾過剤などによるゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等の吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により精製し、これらの手段を用いて得られる変異FOD含有溶液から、減圧濃縮凍結乾燥等の処理により精製された変異FODが得られる。

糖化アミノ酸に作用する酵素の活性は下記の方法にて測定した。

#### <<糖化アミノ酸に作用する酵素の活性測定法>>

##### <反応液の組成>

50mM	トリス緩衝液 pH7.5
0.03%	4アミノアンチピリン (4-AA) (和光純薬社製)
0.02%	フェノール (和光純薬社製)
4.5U/ml	パーオキシダーゼ (POD) (シグマ社製)
1.0mM	$\alpha$ -カルボベンズオキシ- $\epsilon$ -D-フルクトシル-L-リジン若しくはフルクトシルバリリン (ハシバラの方法に基づき合成、精製した。Hashiba H, J. Agric. Food Chem. 24 : 70, 1976 以下ZFL、FVと略す。)

上記の反応液1mlを小試験管に入れ、37°C-5分間予備加温した後、適当に希釈した酵素液0.02mlを添加して攪拌し、反応を開始する。正確に10分間反応の後に0.5%のSDSを2ml添加して反応を停止し、波長500nmの吸光度を測定する(As)。またブランクとして酵素液のかわりに蒸留水0.02mlを用いて同一の操作を行って吸光度を測定する(Ab)。この酵素作用の吸光度(As)と盲検の吸光度(Ab)の吸光度差(As-Ab)より酵素活性を求める。別にあらかじめ過酸化水素の標準溶液を用いて吸光度と生成した過酸化水素との関係を調べ、37°C-1分間に1  $\mu$ molの過酸化水

素を生成する酵素量を1Uと定義する。計算式を下記に示す。

$$\text{酵素活性 (U/ml)} = \frac{(A_s - A_b)}{12.0} \times \frac{3.02}{0.02} \times \frac{1}{10} \times \frac{2}{B}$$

3.02 : 総反応液量(ml)

0.02 : 酵素溶液量(ml)

10 : 反応時間

2 : 過酸化水素2 分子から4-AA、フェノールが縮合した色素1  
分子を生じることによる係数

12.0 : 4-AA-フェノールのミリモル吸光係数

B : 酵素液の希釈倍率

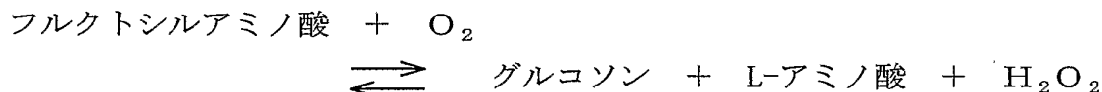
以上の方法によって得られる変異FODのうち、配列表配列番号1のアミノ酸配列372番のリジンがトリプトファンに置換された変異FODの酵素学的性質は以下のようである。

#### (1) 基質特異性

ZFL	100%
FV	0%

#### (2) 酵素作用

下記に示すように、少なくとも $\alpha$ -アミノ酸、 $\varepsilon$ -アミノ酸のアマドリ化合物を分解して、グルコソンと過酸化水素および対応する $\alpha$ -アミノ酸、 $\varepsilon$ -アミノ酸を生成する反応を触媒する。



#### (3) 分子量

本酵素の分子量はSephadex・G-100を用いたカラムゲル濾過法で、0.2MのNaCl含有0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.0)を溶出液として測定した結果、 $48000 \pm 2000$ 、SDS-PAGEでは $47000 \pm 2000$ であった。

#### (4) 等電点

キャリアアンフォライトを用いる焦点電気泳動法によって4℃、700Vの定電圧で40時間通電した後、分画し、各画分の酵素活性を測定した結果、 $\text{pH}4.3 \pm 0.2$ で

あった。

(5)  $K_m$ 値

50mMのトリス塩酸緩衝液 (pH7.5)

0.03%の4-AA

0.02%のフェノール

4.5U/mlのパーオキシダーゼ

を含む反応液中で合成基質ZFLの濃度を変化させて、ZFLに対する $K_m$ 値を測定した結果、3.4mMの値を示した。

(6) 至適pH

前記の酵素活性測定法に従い、反応液中の50mMのトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) に代えて100mMの酢酸緩衝液 (pH4.4-5.4)、リン酸緩衝液 (pH5.6-7.9)、トリス塩酸緩衝液 (pH7.3-8.5)、およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH8.0-10.3) の各緩衝液を用いて測定した。この結果、pH7.5で最大の活性を示した。

(7) pH安定性

本酵素0.5Uを含有する0.5Mの至適pHを測定するときに用いた各種緩衝液0.5mlを40℃、10分間処理した後、その残存活性を後記の活性測定法に従って測定した。この結果、pH7.0-9.0の範囲で80%以上の活性を保持していた。

(8) 熱安定性

本酵素0.5Uを0.2Mのトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) で調製し、10分間加熱処理後、その残存活性を活性測定法に従って測定した。この結果、40℃までは残存活性として95%以上を保持した。

(9) 至適温度

40mMのトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を用い、活性測定法に従い、各温度で10分間反応後、0.5%のラウリル硫酸ナトリウム (以下SDSと略称する) 溶液2mlで反応を停止し、波長500nmで吸光度を測定した。この結果、50℃で最大の活性を示した。

次に、FODについて配列表配列番号1のアミノ酸配列372番のリジンを他のアミノ酸に置換することにより糖化バリニン反応性を著しく低下させた変異型FODを用いて被検液中の糖化リジンを消去した後に、糖化バリニンに反応性を有するFODを用いて被検液中の糖化バリニンを測定する方法について述べる。

被検液中の糖化リジンを消去するFODは糖化バリンに作用しないFODであればなんら限定されるものではないが、例えばFODについて配列表配列番号1のアミノ酸配列372番のリジンを他のアミノ酸に置換することにより糖化バリン反応性を著しく低下させた変異型FODが用いられ、さらに好適には変異FODのうち、配列表配列番号1のアミノ酸配列372番のリジンがトリプトファン、メチオニン、バリンのいずれかに置換された変異FODを用いれば良い。このとき反応液に添加する酵素量は被検液中の糖化リジンを消去するのに十分な量であればよく、例えば、0.5～200U/ml、好適には1～50U/mlである。

また、糖化バリンを測定するFODについては糖化バリンに反応性を持つFODであれば何ら限定されるものではなく、例えば、フザリウム・オキシスポルムIFO-9972株由来FODを用いれば良い。このとき反応液に添加する酵素量は被検液中の糖化バリンを測定するのに十分な量であればよく、例えば、0.5～200U/ml、好適には1～50U/mlである。

具体的な測定方法は、まず、第一反応にて、糖化リジンおよび糖化バリンを含有する被検液中の糖化リジンに変異型FODを作用させ、このとき生成する過酸化水素はカタラーゼ等によって分解させ、第二反応にて、被検液中の糖化バリンにFODを作用させ生成する過酸化水素を4-アミノアンチピリン(4-AA)およびトリンダー試薬と反応させ、生成する色素を比色測定すればよい。また、第二反応液中にカタラーゼの阻害剤であるアジ化ナトリウムを添加してもよい。

本発明を用いて糖化蛋白質を正確に測定する際に使用しうるグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤としては、被検液に、プロテアーゼをグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤存在下作用せしめ、主にグロブリン成分以外の蛋白質を断片化しうるグロブリン成分選択的な阻害剤であればいかなる阻害剤を用いても良い。その好ましい例としてはデオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、コール酸アミド、第四級アンモニウム塩、第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤、コンカナバリンA、オクチルグルコシド若しくはベタインがあげられる。

デオキシコール酸アミドとしては、例えばビスグルコナミドプロピルデオキシコーラミド(N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)deoxycholamido)等が好ましく、コール酸アミドとしては、例えば、硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonicacid)、硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ハ



イドロキシ-1-プロパン(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid)若しくはビスグルコナミドプロピルコーラミド(N,N-Bis(3-D-gluconamido propyl)cholamido)等が好ましい。

第四級アンモニウム塩としては、例えば塩化ベンジルトリエチルアンモニウム、塩化ベンジルトリ-n-ブチルアンモニウム等が好ましく、第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤としては、例えば塩化ラウリルトリメチルアンモニウム若しくはラウリルジメチルアミンオキサイド等が好ましい。

これらのグロブリン成分選択的な阻害剤は単独若しくは組み合わせて用いても良い。

また、これらのグロブリン成分選択的な阻害剤の使用濃度としては、プロテアーゼ作用中にグロブリン成分への作用を十分抑えられる量であれば良く、例えばデオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、コール酸アミド、オクチルグルコシド、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤を用いる場合には0.01%~20%程度の濃度で使用することが好ましく、さらに好ましくは0.05%~10%でありまたこれ以外の濃度を用いることもできる。

また同様に例えばコンカナバリンA、オクチルグルコシドもしくはベタインを用いる場合にはそれぞれ0.01~10mg/ml、0.005~5%の濃度で使用することが出来、またそれぞれ0.02~2mg/ml、0.01~2%の濃度で使用することが好ましくこれ以外の濃度を用いることもできる。

本発明を用いて糖化蛋白質を正確に測定する際に使用しうるASOxとしては、被検液に含まれるアスコルビン酸に有効に作用するものであればいかなるものを用いても良いが、例えば植物または微生物由来のASOx等が挙げられる。具体的な例を以下に示すがこれらは1例に過ぎず、なんら限定されるものではない。

植物由来のASOxの例としては、キュウリ由来(アマノ社製、東洋紡社製)およびカボチャ由来(ロシュ社製、東洋紡社製)が挙げられる。

微生物由来のASOxの例としてはアクレモニウム(Acremonium)由来(旭化成社製)、微生物由来(アマノ社製)が挙げられる。

ASOxの活性は下記の方法にて測定した。

<<ASOxの活性測定法>>

<保存基質溶液>

Lアスコルビン酸(和光純薬社製) 176mgとEDTA(第一化学薬品社製) 37mgを1m

M塩酸100mlで溶解する。

<反応試薬混合液>

上記の保存基質溶液を0.45mMのEDTAを含む90mM 燐酸2カリ―5mM燐酸1ナト緩衝液で20倍に希釈する。

<操作>

上記の反応試薬混合液1mlを小試験管に入れ、30℃-5分間予備加温した後、適当に希釈した酵素液0.10mlを添加して攪拌し、反応を開始する。正確に5分間反応の後に0.2N塩酸水溶液3.0mlを添加して反応を停止し、波長245nmの吸光度を測定する(As)。またブランクとして上記の反応液1mlを小試験管に入れ、30℃-5分間予備加温した後、0.2N塩酸水溶液3.0mlを添加して反応を停止する。適当に希釈した酵素液0.10mlを添加して攪拌し、波長245nmの吸光度を測定する(Ab)。この酵素作用の吸光度(As)と盲検の吸光度(Ab)の吸光度差(Ab-As)より酵素活性を求める。30℃-1分間に1 $\mu$ molのアスコルビン酸をデヒドロアスコルビン酸に酸化する酵素量を1Uと定義する。計算式を下記に示す。

$$\text{活性 (U/ml)} = \frac{(A_b - A_s)}{10.0} \times \frac{1}{5} \times \frac{4.10}{0.10} \times \frac{1}{B}$$

10.0 : pH1.0の条件でアスコルビン酸の245nmに於けるミリモル分子吸光係数

5 : 反応時間 (min)

4.10 : 反応液総量(ml)

0.10 : 反応に供した酵素試料液量

B : 酵素液の希釈倍率

また、これらのASOxの使用濃度としては、プロテアーゼとASOxを共存させ保存する場合に、試薬使用時でも十分なアスコルビン酸の消去が可能な量であれば良く、例えば通常0.1U/ml～100U/ml、好ましくは1U/ml～50U/mlの濃度で用いればよい。

本発明を用いて糖化蛋白質を正確に測定する際にASOxと組み合わせて使用する4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たない緩衝剤としては、プロテアーゼとASOxを共存させた状態で、ASOxが安定である緩衝剤であればいかなるものを用いても良いが、例えば3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸 (EPPS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタ

ンスルホン酸 (HEPES) 及び2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸 (HEPPSO) 等の4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持つ緩衝剤以外の緩衝剤であればいかなる緩衝剤を用いても良い。

さらに、好ましい緩衝剤の例としては、例えばN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸 (ACES)、N-(2-アセトアミド)イミノジ酢酸 (ADA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸 (BES)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン (Bicine)、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン (Bis-Tris)、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸 (CAPS)、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸 (CAPSO)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸 (CHES)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (DIPSO)、2-モルフィリノエタンスルホン酸 (MES)、3-モルフィリノプロパンスルホン酸 (MOPS)、2-ヒドロキシ-3-モルフィリノプロパンスルホン酸 (MOPSO)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸 (PIPES)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸) (POP SO)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPS)、2-ハイドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPSO)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノプロパンスルホン酸 (TES)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン (Tricine) およびトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) 等があげられる。

最も好ましい緩衝剤の例としては例えばトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) 及びピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸) (POP SO) が挙げられる。

これらのASOxと共に使用する緩衝剤の使用濃度としては、プロテアーゼ共存下でもASOxが安定である濃度であり、かつプロテアーゼ及びASOxの反応に影響を及ぼさない濃度であればいかなる量用いても良く、例えば通常1mM~1M、好ましくは5mM~500mMの濃度で用いればよい。

本発明を用いて糖化アルブミンを正確に測定する際に使用しうるアルブミンの蛋白質変性剤及び／またはS-S結合を有する化合物としてはBCPのアルブミンに対する反応性がGA及びNGAで一致すればいかなるものを用いても良い。

好ましい蛋白質変性剤の例としては、例えば、尿素、グアニジン化合物、陰イオン界面活性剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、ポリオキシエチレンア

ルキルフェニルエーテル硫酸エステル塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩が挙げられ、これらは単独若しくは組み合わせて用いることが出来る。また、これらの蛋白質変性剤の使用濃度としては、BCPのアルブミンに対する反応性がGA及びNGAで一致する濃度であれば良く、例えば通常0.01%~10%、好ましくは0.05%~5%の濃度で用いればよい。

好ましいS-S結合を有する化合物としては6,6'-ジチオジニコチン酸(6,6'-dithiodinicotinic acid)、3,3'-ジチオジプロピオン酸(3,3'-dithiodipropionic acid)、2,2'-ジチオジサリチル酸(2,2'-dithiodibenzoic acid)、4,4'-ジチオジモルホリン(4,4'-dithiodimorpholine)、2,2'-ジヒドロキシ-6,6'-ジナフチルジスルフィド(2,2'-dihydroxy-6,6'-dinaphthyl disulfide; DD)、2,2'-ジチオジピリジン(2,2'-dithiopyridine; 2-PDS)、4,4'-ジチオジピリジン(4,4'-dithiopyridine; 4-PDS)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); DTNB)、2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)(2,2'-dithiobis-(5-nitropyridine))等があげられる。

また、これらのS-S結合を有する化合物の使用濃度としては、BCPのアルブミンに対する反応性がGA及びNGAで一致する濃度であれば良く、例えば通常1  $\mu$ M~10mM、好ましくは10  $\mu$ M~5mMの濃度で用いればよく、これ以外の濃度で用いても良い。

本発明を用いて糖化蛋白質を正確に測定する際に使用しうるプロテアーゼの安定化剤としては、試薬保存中にプロテアーゼの活性低下を抑える物質であればいかなるものを用いても良く、特に試薬を液体の状態で保存中にプロテアーゼの活性低下を抑える物質であれば好ましい。

好ましい安定化剤の例としてはジメチルスルホキシド、アルコール、水溶性カルシウム塩、食塩、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤があげられる。アルコールの例としては、エタノール、プロパノール、エチレングリコール、グリセリン等が、第四級アンモニウム塩第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤の例としてはラウリル硫酸トリエタノールアミン、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム等があげられる。

また、これらのプロテアーゼ安定化剤の使用濃度としては、試薬保存中にプロテアーゼの活性低下を抑える物質であればいかなる濃度で用いても良く、特に試薬を液体の状態で保存中にプロテアーゼの活性低下を抑える濃度であれば好まし

い。好ましい濃度の例としては、例えば通常0.01%~30%、好ましくは0.1%~20%の濃度で用いればよく、これ以外の濃度で用いても良い。

本発明を用いて糖化蛋白質を正確に測定する際に使用しうる少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤としては、試薬保存中に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の活性低下を抑える物質であればいかなるものを用いても良く、特に試薬を液体の状態で保存中に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の活性低下を抑える物質であれば好ましい。

好ましい安定化剤の例としては糖アルコール、スクロース、水溶性マグネシウム塩、水溶性カルシウム塩、硫安、アミノ酸、ザルコシンがあげられる。糖アルコールの例としては、ソルビトール、マンニトール、トレハロース、グリセリン等が、アミノ酸としては全てのアミノ酸に強い安定化効果があるが中でもより好ましくは、プロリン、グルタミン酸、アラニン、バリン、グリシン、リジン等があげられる。

また、これらの少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤の使用濃度としては、試薬保存中に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の活性低下を抑える物質であればいかなる濃度で用いても良く、特に試薬を液体の状態で保存中に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の活性低下を抑える濃度であれば好ましい。好ましい濃度の例としては、例えば糖アルコール、スクロース、アミノ酸、ザルコシンの場合、通常0.01%~30%、好ましくは0.1%~20%の濃度で用いればよく、水溶性マグネシウム塩、水溶性カルシウム塩、硫安の場合、通常1mM~1M、好ましくは10mM~500mMの濃度で用いればよく、これ以外の濃度で用いても良い。

本発明の糖化蛋白質測定用組成物に於ける液組成については、プロテアーゼを含む蛋白質分解試薬、生成した糖化アミノ酸若しくはペプチドの測定を行う糖化アミノ酸測定試薬を同一反応槽中で使用できるよう適宜組み合わせれば良い。またこれらの試薬は液状品及び液状品の凍結物あるいは凍結乾燥品として提供できる。

本発明に使用しうる蛋白質分解試薬組成としては、蛋白質分解反応が効率よく進行するようにpH、緩衝剤及びプロテアーゼ濃度を決定し、その後グロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤、ASOx、プロテアーゼ安定化剤を前述の有効な濃度になるよう適宜調製して添加すればよい。

例えばプロテアーゼタイプXXIV（シグマ社製）を用いる場合にはpHが7～10付近で蛋白質分解活性が強く、反応のpHは7～10を選択できる。緩衝液としては4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たない緩衝剤である例えばpH7.2～8.5に緩衝作用のあるPOPSO緩衝液を使用することが出来、POPSOの濃度は1～100mMの濃度、好ましくは10～500mMで使用すればよい。

またプロテアーゼ添加濃度は実際に使用される反応時間中に被検液中の糖化蛋白質を十分に分解し得る濃度で有れば良く、100～50万PU/mlが好ましく、500～10万PU/mlがより好ましい。

グロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤、ASO<sub>x</sub>、プロテアーゼ安定化剤との組み合わせとしては、例えばグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤として硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン、0.01%～20%、好ましくは0.05%～10%、カボチャ由来アスコルビン酸オキシダーゼ（東洋紡社製）、0.1U/ml～100U/ml、好ましくは1U/ml～50U/ml、プロテアーゼ安定化剤としてジメチルスルホオキシド0.01%～30%、好ましくは0.1%～20%等を用いることができる。

本発明に使用しうる糖化アミノ酸測定試薬組成については、使用する少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の至適pHを考慮し反応が効率よく進行するようにpHを選択し、次に糖化アミノ酸に作用する酵素量を決定し、最後に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤を添加すればよい。

例えばR-FOD 若しくはR-FOD-II（旭化成社製）を使用する場合、最大活性の50%以上の活性を示す領域がpH6.5～10と広く、反応のpHは6.5～10を選択できる。また酵素添加濃度は、使用される反応液中で糖化アミノ酸を十分に検出し得る濃度で有れば良く、0.5～200U/mlが好ましく、1～50U/mlがより好ましい。

少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤としては、例えばグルタミン酸を用いることができ、0.01%～30%、好ましくは0.1%～20%の濃度で用いればよい。

本発明に使用しうる第1試薬に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素、第2試薬にプロテアーゼを含有する組成物としては、第1試薬をプロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の作用可能な条件、例えばpH、塩濃度、等を設定し、第2試薬にはプロテアーゼの保存に適した条件を設定すれば如何なる条件を用いても良い。

例えばR-FOD、プロテアーゼタイプXXIVを使用する場合には、それぞれpH6.5～10、7～10で酵素が良く作用することから第1試薬はpH7～10を選択し比較的高濃度の例えば20～1000mMの緩衝剤濃度を選択すればよい。一方本プロテアーゼはpH7以下で安定であることから、第2試薬のpHは7以下を選択し第1試薬よりも比較的低濃度の例えば1～50mM緩衝剤濃度を選択し、加えて例えばジメチルスルホキシド1～50%程度のプロテアーゼ安定化剤を添加すると好ましい。この場合第1試薬と第2試薬の混合の割合を例えば4：1と第1試薬を多くすればさらに高濃度の安定化剤や第1試薬からかけ離れたpH等が選択可能である。

さらに本発明に基づく糖化蛋白質を測定する酵素反応組成には、例えば界面活性剤、塩類、緩衝剤、pH調製剤や防腐剤などを適宜選択して添加しても良い。

界面活性剤としてはポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ポリビニルアルコール等の0.01～10%、好適には0.05～5%、各種金属塩類、例えば塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マンガン、塩化コバルト、塩化亜鉛、塩化カルシウム等の1mM～5M、好適には10mM～1M、各種緩衝液、例えばトリス塩酸緩衝液、グリシン-NaOH緩衝液、リン酸緩衝液、グッドの緩衝液等の10mM～2M、好適には20mM～1M、各種防腐剤、例えばアジ化ナトリウムの0.01～10%、好適には0.05～1%を適宜添加すれば良い。

本発明に使用しうる糖化蛋白質の測定方法としては、前記本発明の糖化蛋白質測定用組成物に被検液0.001～0.5mlを加え、37℃の温度にて反応させ、レートアッセイを行う場合には、反応開始後一定時間後の2点間の数分ないし数十分間、例えば3分後と4分後の1分間、または3分後と8分後の5分間における変化した補酵素、溶存酸素、過酸化水素若しくはその他生成物の量を直接または間接的に前記の方法で測定すれば良く、エンドポイントアッセイの場合には反応開始後一定時間後の変化した補酵素、溶存酸素、過酸化水素若しくはその他生成物の量を同様に測定すれば良い。この場合既知濃度の糖化蛋白質を用いて測定した場合の吸光度等の変化と比較すれば被検液中の糖化蛋白質量を求めることができる。

本発明に使用しうる少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素作用の検出は、例えばデヒドロゲナーゼを用いた場合には補酵素の変化量を直接測定するか、若しくは生じた還元型補酵素を各種ジアフォラーゼ、またはフェナジンメトサルフェ

ート等の電子キャリアー及びニトロテトラゾリウム、WST-1、8（以上同人化学研究所社製）に代表される各種テトラゾリウム塩等の還元系発色試薬を用い間接的に測定しても良く、またこれ以外の公知の方法により直接、間接的に測定しても良い。

また例えばオキシダーゼを用いた場合には、酸素の消費量または反応生成物の量を測定することが好ましい。反応生成物として、例えばR-FODを用いた場合には反応により過酸化水素及びグルコソンが生成し、過酸化水素及びグルコソン共に公知の方法により直接、間接的に測定する事が出来る。

上記過酸化水素の量は、例えばパーオキシダーゼ等を用いて色素等を生成し、発色、発光、蛍光等により測定しても良く、また電気化学的手法によって測定しても良く、カタラーゼ等を用いてアルコールからアルデヒドを生成せしめて、生じたアルデヒドの量を測定しても良い。

過酸化水素の発色系は、パーオキシダーゼの存在下で4-AA若しくは3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)等のカップラーとフェノール等の色原体との酸化縮合により色素を生成するトリンダー試薬、パーオキシダーゼの存在下で直接酸化、呈色するロイコ型試薬等を用いることが出来る。

トリンダー型試薬の色原体としては、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等が使用可能であり、具体例として、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS)、N,Nビス(4-スルホプロピル)-3-メチルアニリン2ナトリウム(TODB)（以上同人化学研究所社製）等が挙げられる。

またロイコ型試薬の具体例としては、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-ビス(ジメチルアミノ)ビフェニルアミン(DA64)、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン(DA67)（以上和光純薬社製）等が挙げられる。

蛍光法には、酸化によって蛍光を発する化合物、例えばホモバニリン酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸等を、化学発光法には、触媒としてルミノール、ルシゲニン、イソルミノール等を用いることが出来る。

また過酸化水素を電極を用いて測定する場合、電極には、過酸化水素との間で電子を授受する事の出来る材料である限り特に制限されないが、例えば白金、金若しくは銀等が挙げられ、電極測定方法としてはアンペロメトリー、ポテンショ



メトリー、クーロメトリー等の公知の方法を用いることが出来、さらにオキシダーゼまたは基質と電極との間の反応に電子伝達体を介在させ、得られる酸化、還元電流或いはその電気量を測定しても良い。電子伝達体としては電子伝達機能を有する任意の物質が使用可能であり、例えばフェロセン誘導体、キノン誘導体等の物質が挙げられる。またオキシダーゼ反応により生成する過酸化水素と電極の間に電子伝達体を介在させ得られる酸化、還元電流またはその電気量を測定しても良い。

糖化蛋白質が糖化アルブミンであり、糖化アルブミン割合を正確に測定する場合に、本発明において用いることができるアルブミン測定試薬としては、蛋白質変性剤及び／またはS-S結合を有する化合物及びブロモクレゾールパープルを含有する組成物として調製されているものであり、GAとNGAの間で測定に乖離を生じない組成であればいかなる組成を用いても良い。

例えば蛋白質変性剤及び／またはS-S結合を有する化合物としてラウリル硫酸ナトリウム及び5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を用いる場合には、BCPの発色に影響を与えないように低濃度の緩衝液例えば1~20mMを用い、ラウリル硫酸ナトリウム0.01%~10%、好ましくは0.05%~5%及び5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)1 $\mu$ M~10mM、好ましくは10 $\mu$ M~5mMの濃度で用いれば良い。またBCPは中性以上で激しく着色することからpH4.5~7.5で使用すると良い。

本発明に使用しうるアルブミンの測定方法としては、前記本発明のアルブミン測定用組成物に被検液0.001~0.5mlを加え、37℃の温度にて反応させ、1ポイントアッセイにて反応開始から一定時間後の色素の量を測定すれば良い。アルブミン-BCPの発色の検出は吸収極大が600nm付近であるから、550nm~630nm付近で検出を行うと良い。この場合既知濃度のアルブミンを用いて測定した場合の吸光度及び水のブランクと比較すれば被検液中のアルブミンの量を求めることができる。

本発明の測定対象となる被検液は、少なくとも糖化蛋白質を含有する被検液であれば如何なるものを用いても良いが、好ましい被検液としては血液成分、例えば血清、血漿、血球、全血等が挙げられる。また分離された赤血球も、分離の条件によってはグロブリン成分が混入し測定値に影響を与える可能性があることから好ましい被検液として用いることができる。

本発明の糖化蛋白質測定組成物及び測定方法に於ける測定対象である糖化蛋白質としては、例えばGAまたはGHbが挙げられるが、測定対象となる糖化蛋白質は

何らこれらに限定されるものではなく、何れの糖化蛋白質を測定しても良い。

[図面の簡単な説明]

[図 1]

本発明の実施例 4 に基づく HSA 基質溶液 (4g/dl)、 $\gamma$  グロブリン及びグロブリン I V 基質溶液の測定曲線及び再現性を示すグラフである。

[図 2]

本発明の実施例 5 に基づく Hb 基質溶液 (4g/dl)、 $\gamma$  グロブリン及びグロブリン I V 基質溶液の測定曲線及び再現性を示すグラフである。

[図 3]

本発明の実施例 6 に基づく糖化アルブミンの測定曲線を示すグラフである。

[図 4]

本発明の実施例 9 に基づく糖化蛋白質測定用組成物中のアスコルビン酸オキシダーゼの安定化に及ぼす緩衝剤種類の効果を示すグラフである。

[図 5]

本発明の実施例 11 に基づくプロテアーゼの安定化に及ぼす安定化剤種類の効果を示すグラフである。

[図 6]

本発明の実施例 12 に基づく少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化に及ぼす安定化剤種類の効果を示すグラフである。

[図 7]

本発明の実施例 20 のプラスミド p c m F O D 1 から p c m F O D 5 までの共通構造を示す。

[図 8]

本発明の実施例 21 の本変異フルクトシルアミノ酸オキシダーゼにより混入糖化リジンを消去した糖化バリウム濃度測定反応液と非消去反応液における 555 nm の吸光度の測定結果を示すグラフである。

[図 9]

本発明の実施例 22 に基づくグリコアルブミン割合測定結果の酵素法と HPLC 法の相関を示すグラフである。

[図 10]

本発明の実施例 2 3 に基づく糖化蛋白質測定試薬の反応曲線である。

[発明を実施する最良の形態]

ついで、本発明の実施例を詳しく述べるが、本発明は何らこれにより限定されるものではない。

実施例 1

グロブリン成分に作用しないプロテアーゼをスクリーニングする目的で、プロテアーゼをアルブミン、グロブリン成分及びヘモグロビンに作用させ生じた糖化アミノ酸若しくは糖化ペプチドをR-FOD（旭化成社製）にて測定した。

<基質溶液>

- 1; HSA基質溶液; Albumin Human; Essencially Globulin Free; 25mg/ml、G A%=31.9%、フルクトサミン（FRA）値=256  $\mu$ mol/L [シグマ社製; 基質溶液中のアルブミン濃度はアルブミン測定キット（アルブミンII-HAテストワコー; 和光純薬社製）にて測定、GA%は糖化アルブミン測定計（GAA-2000; 京都第一科学社製）にて測定した。
- 2; G-II, III基質溶液、FRA値48  $\mu$ mol/L [Globulins Human Cohn Fraction II, III; 16.9mg/ml (シグマ社製)]
- 3; G-IV基質溶液、FRA値26  $\mu$ mol/L [Globulins Human Cohn Fraction IV; 6mg/ml (シグマ社製)]
- 4; G-I基質溶液、FRA値77  $\mu$ mol/L [グロベニンI; glovenin-I; 免疫グロブリン製剤 (武田薬品社製)]
- 5; Hb基質溶液; Hemoglobin Human; 55mg/ml、糖化ヘモグロビン率; HbA1c=4.5% [シグマ社製; HbA1c値は糖化ヘモグロビン計 (ハイオートエーワンシー HA-8150 ; 京都第一科学社製) にて測定した。]

なお基質溶液のフルクトサミン値はフルクトサミン測定キット（オートワコーフルクトサミン、和光純薬社製）にて測定した。

<プロテアーゼ反応試料作成>

Hb以外の基質溶液200  $\mu$ l、プロテアーゼ溶液100mg/ml（この濃度が作成できない場合は可能な限り濃い濃度、また溶液状のものはそのままの濃度）40  $\mu$ l、及び1Mトリス緩衝液（pH8）10  $\mu$ lを良く混合し37℃-30分反応させ、1万膜（ウルトラフリーMC; ミリポア社製）で濾過し、濾液をプロテアーゼ反応試料とした。また、

基質の代わりに蒸留水を用い同様の操作を行い、ブランク試料とした。

一方Hb基質溶液の場合は基質溶液150  $\mu$ l、プロテアーゼ溶液200mg/ml (この濃度が作成できない場合は可能な限り濃い濃度、また溶液状のものはそのままの濃度)を60  $\mu$ l及び1Mトリス緩衝液 (pH8) 5  $\mu$ lを良く混合し37°C-60分反応させ、1万膜(ウルトラフリーMC ; ミリポア社製)で濾過し、濾液をプロテアーゼ反応試料とした。また、基質の代わりに蒸留水を用い同様の操作を行い、ブランク試料とした。

<プロテアーゼ反応試料中の糖化アミノ酸及び糖化ペプチドの測定>

<反応液組成>

50mM	トリス緩衝液 pH8.0
0.02%	4-AA (和光純薬社製)
0.02%	N-エチル-N- (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) -m-トルイジン (TOOS) (同人化学研究所社製)
2U/ml	R-FOD (旭化成社製)
5U/ml	POD (シグマ社製)

<反応手順>

上記糖化アミノ酸測定反応液300  $\mu$ lをセルに分注し37°C-3分間インキュベーションし555nmを測光する(A0)。続いてプロテアーゼ反応試料30  $\mu$ lを添加し37°C-5分間インキュベーションし555nmを測光する(A1)。またプロテアーゼ反応試料の代わりにブランク試料を用い同様の操作を行いA0ブランク、A1ブランクを測定する。プロテアーゼの糖化蛋白質への作用を吸光度変化で示すと下式となる。

$$\Delta A = (A1 - A0) - (A1 \text{ブランク} - A0 \text{ブランク})$$

pH8.0における代表的なプロテアーゼのアルブミン、グロブリン、ヘモグロビンへの作用( $\Delta A$ )を表1に示す。

表1 各種プロテアーゼの各種蛋白質に対する作用 (単位 ; m A b s)

プロテアーゼ名称	由来	$\Delta A$		
		HSA	GI	Hb
カルボキシペプチダーゼA	牛 脾臓	<1	50	13
アミノペプチダーゼM		<1	21	<1
プロテアーゼタイプI		52	25	9
トリプシン		11	15	<1
キモトリプシン		25	103	7
パンクレアチン		52	100	17
カルボキシペプチダーゼW	小麦	7	18	1
パパイア	パパイア	15	5	<1
プロテアーゼタイプVIII	バチルス	90	84	33
IX		33	12	<1
XXIV		172	91	2
XXVII		93	88	27
アルカラールゼ		92	49	17
オリエンターゼ-22BF		168	51	24
-90N		136	44	5
ビオプラールゼSP-4FG		63	37	9
GODO-BAP		37	31	14
トヨチームNEP-160		130	47	23
アルカリックプロテアーゼ		133	50	19
結晶プロテアーゼNAK		180	18	30
プロテアーゼタイプXIX	アスペルギルス	20	22	33
XXIII		49	27	11
フレーバーザイム		59	17	25
プロチンFN		37	20	<1
プロテアーゼA		44	16	19
スミチームMP		76	35	27
FP		37	7	11
ニューラーゼF	リゾパス	<1	18	9
PD酵素	ペニシリウム	<1	19	1
プロナーゼ	ストレプトマイセス	109	152	42
プロテアーゼタイプXIV		112	125	41
XXI		75	35	11
XXVII	スタフィロコッカス	<1	20	<1
カルボキシペプチダーゼY	酵母	2	14	4
プロテイナーゼK	トリチラチウム	79	45	32
アミノペプチダーゼT	サーマス	<1	18	<1
アクロモペプチダーゼ	アクロモバクター	24	3	16
リジルエンドプロテイナーゼ		13	26	7

G-IV基質溶液中の糖化蛋白質に対する作用はどのプロテアーゼも小さい若しくは0であったため、またG-II、-III基質溶液の測定値とG-I基質溶液の測定値がほぼ同じであったために表1にはグロブリン成分についてG-I基質溶液の結果のみを記載した。表1から分かるようにアスペルギルス (*Aspergillus*) 属由来のプロテアーゼ、及びプロテアーゼタイプXIVはグロブリン成分中の糖化グロブリンにも良く作用している。

しかしながらアルブミン中のGA及びヘモグロビン中のGHbに作用するエンド型エキソ型プロテアーゼは共にグロブリン成分中の糖化グロブリンに作用を示した。よって血清又は血漿中のGA若しくは全血及び血球中のGHbを測定する場合にプロテアーゼの選択のみではグロブリン成分の影響を回避できないと考えられた。

## 实施例 2

## &lt;グロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング&gt;

前記HSA基質溶液に高い作用を示すプロテアーゼタイプXXIV（シグマ社製）を用いて、HSA基質溶液を基準に、前記各種グロブリン基質溶液へのプロテアーゼ作用を低下させる物質をスクリーニングした。

＜反応液組成＞

## R-1 蛋白質分解試薬

150mM トリシン緩衝液（和光純薬社製） pH8.5

2500U/ml プロテアーゼタイプXXIV (シグマ社製) + グロブリン選択的な  
プロテアーゼ阻害剤(デオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、  
コール酸アミド、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウ  
ム塩型陽イオン界面活性剤;1%、コンカナバリンA;0.21mg/ml、ベ  
タイン;0.1%、オクチルグルコシド;1%; 同人化学研究所社製)

## R-2 糖化アミノ酸測定試薬

150mM トリシン緩衝液（和光純薬社製） pH8.5

0.12% 4-AA(和光純薬社製)

0.08% T00S (同人化学研究所社製)

24U/ml R-FOD (旭化成工業社製)

20U/ml POD (シグマ社製)

R-1 蛋白質分解試薬中のデオキシコール酸アミドとしては、ビスグルコナミド

プロピルデオキシコーラミドを、コーラ酸アミドとしては硫酸-3-[(コーラアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン、硫酸-3-[(コーラアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ハイドロキシ-1-プロパン若しくはビスグルコナミドプロピルコーラミド、第四級アンモニウム塩としては塩化ベンジルトリエチルアンモニウム、塩化ベンジルトリ-n-ブチルアンモニウム、第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤としては、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム及びラウリルジメチルアミノオキサイドを使用した。

#### <基質溶液>

- 1; HSA基質溶液; Albumin Human; 40mg/ml、GA%=10.5%[和光純薬社製; 基質溶液中のアルブミン濃度はアルブミン測定キット(アルブミンII-HAテストロー; 和光純薬社製)にて測定し、GA%は糖化アルブミン測定計(GAA-2000; 京都第一科学社製)にて測定した。]
- 2;  $\gamma$ グロブリン添加基質溶液; 上記HSA基質溶液に $\gamma$ グロブリン [ $\gamma$  Globulins Human (シグマ社製) フルクトサミン値 $34\mu\text{M}$ ] 17.0mg/mlを添加した。

#### <反応手順>

37°CにインキュベートされたR-1;  $240\mu\text{l}$ に基質溶液 (HSA基質溶液、G-I基質溶液)  $8\mu\text{l}$ を添加し、37°Cで反応を開始し、正確に5分後にR-2;  $80\mu\text{l}$ を添加した。R-2添加前後の546nmの吸光度を測定し、その差を吸光度変化とした。また基質の代わりに蒸留水を用い同様の操作を行い、ブランク試料とし、さらにグロブリン選択的なプロテアーゼ阻害剤を添加しない反応液をコントロールとした。

HSA基質溶液から得られた吸光度変化からブランク試料の吸光度変化を差し引いた $\Delta A(\text{HSA})$ 及び $\gamma$ グロブリン添加基質溶液から得られた吸光度変化からブランク試料の吸光度変化を差し引いた $\Delta A(+\gamma\text{グロブリン})$ を算出し、

$\gamma$ グロブリン添加の影響

$$= (\Delta A(+\gamma\text{グロブリン}) - \Delta A(\text{HSA})) / \Delta A(\text{HSA}) \times 100 (\%)$$

様々な候補物質の共存下及び非共存下 (コントロール試料) にて比較した。その結果を表2に示す。

表2 グロブリン選択的なプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング

添 加 物 名 称	添加濃度 (%)	γグロブリン添加 の影響 (%)
コントロール	—	23.8
コール酸誘導体		
コール酸	1.0	23.0
デオキシコール酸	1.0	20.0
ビスグルコナミドプロピルデオキシコーラミド	1.0	19.9
硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアン モニオ]-1-プロパン	1.0	17.9
硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアン モニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパン	1.0	18.0
ビスグルコナミドプロピルコーラミド	1.0	21.0
第4級アンモニウム塩		
塩化ベンシルトリメチルアンモニウム	1.0	23.2
塩化ベンシルトリエチルアンモニウム	1.0	16.5
塩化ベンシルトリブチルアンモニウム	1.0	15.1
臭化ベンシルトリメチルアンモニウム	1.0	23.1
臭化ベンシルトリエチルアンモニウム	1.0	22.9
第4級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤		
塩化ラウリルトリメチルアンモニウム	1.0	16.7
塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウム	1.0	23.2
ラウリルジメチルアミノオキサド	1.0	17.8
その他		
ベタイン	0.10	7.6
コンカナバリンA	0.21mg/ml	14.9
オクチルグルコシド	1.0	18.5

表2から分かるようにデオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、コール酸アミド、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤、コンカナバリンA、オクチルグルコシド及びベタインにグロブリンへのプロテアーゼ作用を阻害する効果が確認され、これらグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤及びプロテアーゼを用いることにより主にグロブリン以外の蛋白質を断片化できることが明白となった。

さらにHSA基質溶液の代わりにHb基質溶液を用い同様の測定を行った。但しHb基質溶液を用いた場合にはR-1反応終了後、トリクロル酢酸にて除蛋白、中和後R-2を添加し評価を行った。Hb基質溶液を用いた場合にもデオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、コール酸アミド、第四級アンモニウム塩若しくは第四級



アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤、コンカナバリンA及びベタインにグロブリンへのプロテアーゼ作用を阻害する効果が確認された。

### 実施例 3

＜硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンのグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害効果＞

様々なプロテアーゼを用い、硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンのグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害効果を確認した。

#### R-1 蛋白質分解試薬

150mM トリシン緩衝液（和光純薬社製）pH8.5

2500U/ml プロテアーゼ\*

1% 硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン

\* プロテアーゼはオリエンターゼ22BF(阪急バイオインダストリー社製)、プロテアーゼタイプVIII、プロテアーゼタイプXIV、プロテアーゼタイプXXVII（以上シグマ社製）を使用した。

#### R-2 糖化アミノ酸測定試薬

実施例 2 に同じ

＜基質溶液＞

実施例 2 に同じ。

＜反応手順＞

実施例 2 に同じ手順で、γ グロブリン添加の影響を硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンの共存下及び非共存下（コントロール試料）にて比較した。その結果を表 3 に示す。なお、判定の欄について、γ グロブリンの添加の影響が有意に低下した場合に○とした。

表 3 硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンのグロブリン選択的なプロテアーゼ阻害効果

プロテアーゼ名称	添加濃度 (%)	γ グロブリン添加の影響 (%)	判定
オリエンターゼ22BF	0.0	20.8	—
	1.0	11.8	○

プロテアーゼタイプVIII	0.0	20.3	—
	1.0	15.6	○
プロテアーゼタイプXIV	0.0	30.6	—
	1.0	20.6	○
プロテアーゼタイプXXVII	0.0	28.6	—
	1.0	19.0	○

表3から分かるようにオリエンターゼ22BF、プロテアーゼタイプVIII、プロテアーゼタイプXIV、プロテアーゼタイプXXVIIはすべて硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン共存下に $\gamma$ グロブリン基質へのプロテアーゼ作用が低下し、一方HSA基質に対する作用は保持されていた。このことから本発明におけるグロブリン成分選択的なプロテアーゼ阻害剤はプロテアーゼの種類を問わず有効であることが明らかとなった。

さらに同様にGHbを測定する場合にも本発明を用いることにより、グロブリン成分の影響を回避できた。

#### 実施例4

##### <糖化アルブミンの希釈直線性>

##### R-1 蛋白質分解試薬

- 150mM      トリシン緩衝液（和光純薬社製）pH8.5
- 2500U/ml    プロテアーゼタイプXXVII（シグマ社製）
- 1%          硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ハイドロキシ-1-プロパン（シグマ社製）

##### R-2 糖化アミノ酸測定試薬

実施例2に同じ

##### <基質溶液>

- 1：HSA基質溶液；実施例1と同じ。但し濃度は4.0g/dlで用いた。
- 2： $\gamma$ グロブリン基質溶液；実施例2と同じ。
- 3：グロブリンIV基質溶液；実施例1と同じ。

##### <操作>

HSA基質溶液(4g/dl)、 $\gamma$ グロブリン( $\gamma$ G)及びグロブリンIV(GIV)基質溶液(1.7g/dl)の0.0、0.5、1.0、1.5、2.0倍濃度の試料を調製し希釈直線性を確認し

た。操作は実施例 3 に同じ。但し HSA 1.0 倍濃度は 10 回測定し CV 値を計算した。その結果を図 1 に示す。

図 1 から分かるように  $\gamma$  グロブリン及びグロブリン IV 基質溶液共に濃度を変化させても吸光度変化が得られなかった。一方 HSA 基質溶液は濃度に応じて良好な直線性が得られ、グロブリン成分の影響を実質的に受けずに糖化アルブミンが測定されていることが明白である。また HSA 1.0 倍濃度では CV 値 = 0.9% と良好な再現性が確認されており、本発明の測定系を用いて 10 分の反応時間で糖化アルブミンが選択的に、感度良く、また再現良く測定されていることが明らかとなった。

#### 実施例 5

##### <糖化ヘモグロビンの希釈直線性>

##### R-1 蛋白質分解試薬

77mM          トリス緩衝液    pH8.0  
2500U/ml      プロテアーゼタイプ XIV (シグマ社製)  
1%            硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ハ  
                 イドロキシ-1-プロパン (シグマ社製)

##### R-2 糖化アミノ酸測定試薬

実施例 2 に同じ。

##### <基質溶液>

実施例 1 と同一の Hb 基質溶液及び実施例 4 と同じ  $\gamma$  グロブリン及びグロブリン IV 基質溶液を使用した。

##### <操作>

Hb 基質溶液 (4g/dl)、 $\gamma$  グロブリン及びグロブリン IV 基質溶液 (1.7g/dl) の 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 倍濃度の試料を調製し希釈直線性を確認した。操作は実施例 1 に同じ。但し Hb 1.0 倍濃度は 10 回測定し CV 値を計算した。その結果を図 2 に示す。

図 2 から分かるように  $\gamma$  グロブリン及びグロブリン IV 基質溶液共に濃度を変化させても吸光度変化が得られなかった。一方 Hb 基質溶液は濃度に応じて良好な直線性が得られ、グロブリン成分の影響を実質的に受けずに糖化ヘモグロビンが測定されていることが明白である。また Hb 1.0 倍濃度では CV 値 = 2.0% と良好な再現性が確認されており、本発明の測定系を用いて 10 分の反応時間で糖化ヘモグロビンが選択的に、感度良く、また再現良く測定されていることが明らかとなった。

## 実施例 6

## ＜糖化アルブミンの直線性＞

R-1 蛋白質分解試薬 実施例 4 に同じ。

R-2 糖化アミノ酸測定試薬 実施例 4 に同じ。

## ＜基質溶液＞

血清A) \* 糖尿病患者血清 GA%=32.9% ; アルブミン濃度 4.3g/dl

血清B) \* 健常者血清 GA%=16.4% ; アルブミン濃度 4.1g/dl

\* 上記血清A) とB) とを10 : 0、8 : 2、6 : 4、4 : 6、2 : 8、0 : 10の割合で混合し試料とした。

＜操作＞ 実施例 3 に同じ。

結果を図 3 に示す。

図 3 から分かるようにアルブミン濃度を一定にした異なる糖化アルブミン率の試料に於いても良好な直線性が得られた。従って本発明の糖化蛋白質の測定方法により、実際の血清、血漿中の糖化アルブミンを定量的に検出できる事が分かった。また血清の代わりに赤血球を溶血し作成したヘモグロビン基質溶液を用いても同様の直線性が確認された為、本発明の糖化蛋白質の測定方法により、糖化ヘモグロビンを定量的に検出できることも確認できた。

## 実施例 7

## ＜糖化アルブミンHPLC法と酵素法（本発明）の相関性＞

R-1 蛋白質分解試薬 実施例 4 に同じ。

R-2 糖化アミノ酸測定試薬 実施例 4 に同じ。

＜基質溶液＞ 糖尿病患者血清 14検体

健常者血清 25検体

＜操作＞ 操作は実施例 2 に同じ。

糖尿病患者血清14検体を用い本発明に基づく酵素法と、公知のHPLC法の相関を確認した。尚HPLC法の測定は、糖化アルブミン計(GAA-2000 ; アークレイ社製)にて糖化アルブミン率を測定した。本発明に基づく測定方法から得られる吸光度変化は糖化アルブミン率と、相関係数 $r=0.991$ と非常によい相関を示し、本発明に基づく測定方法は糖化アルブミンを正確に測定していることが明らかとなった。

## 実施例 8

＜アスコルビン酸オキシダーゼの安定化に及ぼす緩衝剤種類の効果＞

## &lt;反応液組成&gt;

150mM	各種緩衝液 pH8.0
2500U/ml	プロテアーゼタイプXXIV (シグマ社製) 若しくはプロナーゼ (シグマ社製)
10U/ml	アスコルビン酸オキシダーゼ (ASO-311; 東洋紡社製) 若しくは熱安定型アスコルビン酸オキシダーゼ (ASO-312; 東洋紡社製)

R-1 蛋白質分解試薬中の緩衝剤としては3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸 (EPPS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES)、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸 (HEPPSO)、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、ピペラジン-1,4-ビス (2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸) (POPSO) (以上同人化学研究所社製)及び磷酸 (和光純薬社製)を用いた。

## &lt;操作手順&gt;

上記反応液を各種緩衝剤を用いて作成し、その一部をとり、試薬中のアスコルビン酸オキシダーゼ活性を測定しコントロールとした。活性測定方法は前述の<アスコルビン酸オキシダーゼ (ASO<sub>x</sub>) の活性測定法>を用いた。残りの反応液は室温にて2日間保存後同様に活性を測定した。コントロールの活性に対する、室温-2日間保存後の活性の割合を計算しアスコルビン酸オキシダーゼの安定性を比較した。結果を表4に示す。

表4 アスコルビン酸オキシダーゼの安定性に於ける緩衝剤種類の効果

緩衝剤	相対活性 (%)			
	プロテアーゼタイプXXIV		プロナーゼ	
	ASO-311	ASO-312	ASO-311	ASO-312
EPPS	35	30	13	31
HEPES	31	34	17	37
HEPPSO	37	22	14	34
Tris	52	44	55	62
POPSO	62	56	80	80
磷酸	77	86	88	108

表4からわかるように4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持つ3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸 (EPPS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES) 及び2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸 (HEPPSO) を緩衝剤に用いた場合よりも、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たないトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸) (POPSO) 及び燐酸を緩衝剤に用いた場合、プロテアーゼの共存下に於いてアスコルビン酸オキシダーゼがより安定に存在していることが明白であった。

またアスコルビン酸オキシダーゼ、プロテアーゼの種類に係わらず同様の効果が確認されていることも明白である。

#### 実施例 9

<糖化蛋白質測定用組成物中のアスコルビン酸オキシダーゼの安定化に及ぼす緩衝剤種類の効果>

<反応液組成>

##### R-1 蛋白質分解試薬

150mM	各種緩衝液 pH8.0
2500U/ml	プロテアーゼタイプXXIV (シグマ社製)
2.0mM	4-アミノアンチピリン(和光純薬社製)
10U/ml	アスコルビン酸オキシダーゼ (東洋紡社製)

##### R-2 糖化アミノ酸測定試薬

150mM	HEPES緩衝液 (和光純薬社製) pH7.5
6.0mM	TOOS(同人化学研究所社製)
24U/ml	R-FOD(旭化成社製)
20U/ml	POD(シグマ社製)

R-1 蛋白質分解試薬中の緩衝剤としてはEPPS、HEPES、HEPPSO、Tris及びPOPSOを用いた。

<コントロール基質溶液、アスコルビン酸添加基質溶液>

ヒトプール血清9容に1容のアスコルビン酸 (国産化学社製) 1g/dlを添加しアスコルビン酸添加基質溶液とした。アスコルビン酸の代わりに蒸留水を添加したものをコントロール基質溶液とした。

### <反応手順>

37°CにインキュベートされたR-1; 240  $\mu$  lにコントロール基質溶液若しくはアスコルビン酸添加基質溶液8  $\mu$  lを添加し、37°Cで反応を開始し、正確に5分後にR-2; 80  $\mu$  lを添加した。R-2添加前及び添加5分後の555nmの吸光度を測定した。また基質溶液の代わりに蒸留水を用いた測定をブランクとし、コントロール基質溶液、アスコルビン酸添加基質溶液から得られた吸光度変化からブランク試料の吸光度変化を差し引いた $\Delta A_0$ を算出した。一方同じ反応液R-1を室温にて24時間保存し同様の測定を行い $\Delta A_{24}$ を算出した。コントロール基質溶液から得られた吸光度変化を100としてアスコルビン酸添加基質溶液から得られた $\Delta A_0$ 及び $\Delta A_{24}$ の割合を計算した。結果を図4に示す。

アスコルビン酸は測定系に大きな負の影響を与え100mg/dlの濃度の場合消去反応を行わなければ糖化蛋白質のシグナルが観察できなくなる。図4からわかるようにアスコルビン酸処理能は糖化蛋白質を測定する系でも4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たないTris及びPOPSOにおいて室温-24時間保存後にも変化なく、一方EPPS、HEPES及びHEPPSOを用いた4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持つ緩衝剤の系ではアスコルビン酸処理能が室温-24時間保存後にはほとんど観察されなかった。以上の結果からプロテアーゼとアスコルビン酸オキシダーゼが共存する糖化蛋白質測定試薬に於いても4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持つ緩衝剤に用いた場合よりも、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たない緩衝剤に用いた場合アスコルビン酸オキシダーゼがより安定に存在していることが明白であった。

また本結果から糖化アルブミン、フルクトサミン及び糖化ヘモグロビンの測定に関し本発明が有用であることも明白である。

### 実施例 10

<グリコアルブミン、ノングリコアルブミンに対するブロモクレゾールパープルの作用の違い、及び蛋白質変性剤及び／または、S-S結合を有する化合物の効果>

### <反応液組成>

#### R-1 前処理試薬

10mM Tris-HCl緩衝液 pH8.0 + 各濃度の蛋白質変性剤及び／または、S-S結合を有する化合物、対照としては蒸留水を添加し

た。

## R-2 アルブミン発色試薬

- 200mM    コハク酸緩衝液（和光純薬社製） pH5.5  
0.15mM   ブロモクレゾールパープル（和光純薬社製）  
0.3%      Tx-100（和光純薬社製）

R-1 前処理試薬中の蛋白質変性剤及び／または、S-S結合を有する化合物として以下の1)～9)を用いた。

- 1) 6,6'-ジチオジニコチン酸(6,6'-dithiodinicotinic acid;100mM)
- 2) 3,3'-ジチオジプロピオン酸(3,3'-dithiodipropionic acid;100mM)
- 3) 2,2'-ジチオジサリチル酸(2,2'-dithiodibenzoicacid;100mM)
- 4) 4,4'-ジチオジモルホリン(4,4'-dithiodimorpholine;100mM)
- 5) DTNB(50mM)
- 6) DDD(33mM)
- 7) 2-PDS(25mM)
- 8) 4-PDS(50mM)
- 9) SDS(0.3%)

1)～5)和光純薬社製、6)～9) 同人化学研究所社製

### <試料>

グリコアルブミン、ノングリコアルブミン、健常者血清、患者血清を試料として、ブランクとしては蒸留水を用いた。グリコアルブミン、ノングリコアルブミンはヒト血清よりアルブミンを公知の方法で精製し、ホウ酸固定化樹脂を用いて精製した。

### <反応手順>

37℃にインキュベートされた前処理試薬;160  $\mu$  lに試料2  $\mu$  lを添加し、37℃で反応を開始し、正確に5分後にアルブミン発色試薬;160  $\mu$  lを添加した。アルブミン発色試薬添加前及び添加5分後の600nmの吸光度を測定した。また試料の代わりに蒸留水及びアルブミン濃度が既知である試料から検量線を作成しアルブミン測定値を求めた。またラテックス試薬を用いた免疫法（LX試薬、栄研社製、Alb-II）を別途測定し、コントロールとした。結果を表5に示す。



表 5

	免疫法	BCP法				
試薬種類		なし	1	2	3	4
水	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
NGA	37.5	36.1	35.6	35.7	38.0	39.5
GA	8.1	7.9	7.6	7.9	7.7	7.7
健常者血清	43.0	38.4	38.2	37.9	40.1	41.3
患者血清	40.5	36.2	36.7	37.0	35.0	31.3

(表 5 続き)

	免疫法	BCP法				
試薬種類		5	6	7	8	9
水	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0
NGA	37.5	38.4	36.9	36.8	36.2	37.4
GA	8.1	8.7	7.6	7.8	7.5	7.8
健常者血清	43.0	38.3	39.1	38.9	38.8	43.7
患者血清	40.5	35.5	37.7	36.8	36.2	40.7

表 5 からわかるように、前処理なしの BCP 法では意外にも NGA に於いて低値を示し、同様に NGA の少ない患者では免疫法と BCP 法との乖離は、NGA の多い健常者に比べて小さかった。また、蛋白質変性剤及び／または、S-S 結合を持つ化合物にて前処理することにより免疫法との乖離は有意に小さくなった。なかでも 2, 2'-ジチオサリチル酸、4, 4'-ジチオジモルホリン、DDD、2-PDS、4-PDS、DTNB 及びラウリル硫酸ナトリウムの効果が顕著であった。このことから、糖化アルブミン割合を測定する際に使用するアルブミン試薬として、蛋白質変性剤及び／または、S-S 結合を持つ化合物にて前処理し、続いて若しくは同時に BCP を作用させてアルブミンを測定する方法を用いることにより、NGA により負の誤差を与える現象が回避され、正確に糖化アルブミン割合が測定できることが明白となった。

#### 実施例 1 1

<プロテアーゼの安定化>

<反応液組成>

R-1 蛋白質分解試薬

150mM Tris-HCl 緩衝液 pH8.5

5000PU/ml プロテアーゼタイプ XXIV (シグマ社製)

8mM            4-アミノアンチピリン(同人化学研究所社製)  
 15U/ml        パーオキシダーゼ  
 1.0%        硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ハ  
                  イドロキシ-1-プロパン (シグマ社製) + 各濃度のプロテ  
                  アーゼ安定化剤、対照としては蒸留水を添加した。

## R-2 糖化アミノ酸測定試薬

150mM        Tris-HCl緩衝液 pH8.5  
 24U/ml        R-FOD-II (旭化成社製)  
 12mM        TOOS(同人化学研究所社製)

前処理試薬中のプロテアーゼ安定化剤として以下の1)～7)を用いた。

- 1) 0.5mM    塩化マグネシウム
- 2) 10mM    塩化カルシウム
- 3) 100mM   塩化ナトリウム
- 4) 0.1%    エチレングリコール (EtGly)
- 5) 10%     ジメチルスルホキシド(DMSO)
- 6) 1%      エタノール(EtOH)
- 7) 0.1%    ラウリル硫酸トリアタノールアミン (TEALS)

1)～7)和光純薬社製

### <試料>

5g/dl HSA (シグマ社製; LOT38H7601)

### <反応手順>

37℃にインキュベートされた蛋白質分解試薬;240  $\mu$ lに試料8  $\mu$ lを添加し、37℃で反応を開始し、正確に5分後に糖化アミノ酸測定試薬;80  $\mu$ lを添加した。糖化アミノ酸測定試薬添加前及び添加5分後の546nmの吸光度を測定した。また基質溶液の代わりに蒸留水を用いた測定をブランクとし、基質溶液から得られた吸光度変化からブランク試料の吸光度変化を差し引いた $\Delta A_0$ を算出した。一方同じ反応液蛋白質分解試薬を37℃にて24時間保存し同様の測定を行い $\Delta A_{24}$ を算出した。安定化剤なしで、かつ保存なしの場合の $\Delta A_0$ を100%として、安定化剤有り、無しの場合の相対感度を算出した。結果を図5に示す。

図5からわかるように、安定化剤がない場合、相対感度は60%に低下し蛋白質分解試薬の安定化効果が観察された。一方安定化剤を添加した場合には安定化効

果が塩化カルシウム、塩化ナトリウム、DMSO、EtOH、TEALSに観察され、中でも塩化カルシウム、DMSOに関してはほとんど性能低下は観察されなかった。さらにDMSO及び塩化カルシウムは安定性試験を継続した結果、37℃－4週間保存でも性能低下が観察されず、液状、冷蔵で1年以上の保存安定性を有することが明らかとなった。

## 実施例 1 2

<少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化>

<反応液組成>

### R-1 蛋白質分解試薬

150mM	Tris-HCl緩衝液 pH8.5
8mM	4-アミノアンチピリン(同人化学研究所社製)
15U/ml	パーオキシダーゼ

### R-2 糖化アミノ酸測定試薬

150mM	Tris-HCl緩衝液 pH8.5
24U/ml	R-FOD-II (旭化成社製)
12mM	TODB(同人化学研究所社製) + 各濃度のプロテアーゼ安定化剤、対照としては蒸留水を添加した。

糖化アミノ酸測定試薬中の少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤として以下の1)～15)を用いた。

- |     |       |                |
|-----|-------|----------------|
| 1)  | 5%    | マンニトール         |
| 2)  | 5%    | ソルビトール         |
| 3)  | 5%    | スクロース          |
| 4)  | 5%    | トレハロース         |
| 5)  | 0.5mM | 塩化カルシウム        |
| 6)  | 0.5mM | 塩化マグネシウム       |
| 7)  | 3%    | L-グルタミン酸 (Glu) |
| 8)  | 3%    | L-グルタミン (Gln)  |
| 9)  | 3%    | L-プロリン (Pro)   |
| 10) | 3%    | L-アラニン (Ala)   |
| 11) | 3%    | L-バリン (Val)    |
| 12) | 3%    | グリシン (Gly)     |

- |     |       |            |
|-----|-------|------------|
| 13) | 3%    | L-リジン(Lys) |
| 14) | 3%    | ザルコシン      |
| 15) | 100mM | 硫安         |

1)～14)和光純薬社製

#### <試料>

0.5mM FZL

#### <反応手順>

37℃にインキュベートされた蛋白質分解試薬;240  $\mu$ lに試料8  $\mu$ lを添加し、37℃で反応を開始し、正確に5分後に糖化アミノ酸測定試薬;80  $\mu$ lを添加した。糖化アミノ酸測定試薬添加前及び添加5分後の546nmの吸光度を測定した。また基質溶液の代わりに蒸留水を用いた測定をブランクとし、基質溶液から得られた吸光度変化からブランク試料の吸光度変化を差し引いた $\Delta A_0$ を算出した。一方同じ反応液糖化アミノ酸測定試薬を37℃にて2日間保存し同様の測定を行い $\Delta A_{24}$ を算出した。安定化剤なしで、かつ保存なしの場合の $\Delta A_0$ を100%として、安定化剤有り、無しの場合の相対感度を算出した。結果を図6に示す。

図6からわかるように、安定化剤がない場合、相対感度は30%に低下し糖化アミノ酸測定試薬の安定化効果が観察された。一方安定化剤を添加した場合には安定化効果がマンニトール、ソルビトール、スクロース、トレハロース、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-プロリン、L-アラニン、L-バリン、グリシン、L-リジン、ザルコシン、硫安に観察され、中でも糖アルコール、アミノ酸、ザルコシンに関しては特に強い安定化効果が確認された。さらにL-アラニン、グリシン及びザルコシンは安定性試験を継続した結果、37℃-4週間保存でも性能低下がほとんど観察されず、液状、冷蔵で1年以上の保存安定性を有することが明らかとなった。

#### 実施例 13

##### <変異FOD遺伝子含有DNAフラグメントライブラリーの作成>

配列表配列番号5の塩基配列の1から30の配列を有するオリゴヌクレオチドと配列表配列番号6の塩基配列の1から30の配列を有するオリゴヌクレオチドの合成を外部委託(BEX社)し、さらにフザリウム・オキシスポルムIF0-9972株由来のFOD蛋白質をコードするDNAを鋳型にして、Taqポリメラーゼキット(宝酒造社製)を用いて添付のマニュアルに従ってPCRを実施し、FOD構造遺伝子を増幅した。

この際、反応液中に最終濃度0.5mM相当の2価マンガンイオンを添加し、塩基をd ATP:0.51mM、dCTP:0.20mM、dGTP:1.15mM、dTTP:3.76mMと濃度を偏在させて反応を実施し、変異導入効率を高めた。

#### 実施例 1 4

##### <変異FOD組換え体ライブラリーの作成>

実施例 1 3により増幅したFOD遺伝子含有DNAフラグメントを制限酵素NcoIとEcoRIで消化し、同じ制限酵素で処理したプラスミドoTV119N（宝酒造社製）に組み込み、エシェリヒア・コリJM109株（東洋紡績社製）に導入し、100  $\mu$ g/mlアンピシリン含有LB寒天平板培地（DIFCO社製）上、37℃で一晩培養して形質転換体のコロニーを形成させた。

#### 実施例 1 5

##### <リジン特異的変異FODのスクリーニング>

実施例 1 4で用意したライブラリーのコロニーを2枚の100  $\mu$ g/mlアンピシリンと1mMのIPTG（和光純薬社製）を含有するLB寒天平板培地にレプリカし、それぞれの培地上に5U/mlのパーオキシダーゼ（旭化成社製）、0.02%のオルトジアニシジン（和光純薬社製）、2.0mMの糖化バリンまたは糖化リジン（ハシバラの方法（Hashiba, H. (1976) J. Agric. Food Chem., 24, 70）により調製）を含有するLB寒天（0.3%）培地を重層し、37℃で8時間培養して糖化アミノ酸のFODによる酸化で発生する酸素ラジカルとジアニシジンによるコロニーの発色を観察した。これにより糖化リジンで暗紫色に発色し、糖化バリンで発色しないコロニーをスクリーニングし、該当するコロニーを164株得た。

#### 実施例 1 6

##### <変異FOD候補株の細胞抽出液の調製>

実施例 1 5で得た変異体コロニー164株を50  $\mu$ g/mlのアンピシリンと1mMのIPTGを含有する3.7%のBHI（DIFCO社製）液体培地1.5mlで30℃、16時間培養し、そのうち1mlを遠心分離（15,000G、1分、4℃）により集菌し、200  $\mu$ lの10mMのトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を加え、超音波破碎機を用いて菌体を破碎した後、遠心分離（14,000G、5分、4℃）し、上清を取得して細胞抽出液とした。

#### 実施例 1 7

##### <変異FODの基質特異性検定>

実施例 1 6で調製した細胞抽出液について、含有するFOD変異組換え体の糖化

アミノ酸基質特異性を、前述のFOD酵素活性測定法によって測定した。その結果、候補株の中に糖化バリンへの活性が糖化リジンの活性の1000分の1未満となっている変異体を2つ確認し、目的の変異体とした。

#### 実施例 18

##### <組み換えプラスミドの抽出>

実施例 17 で選ばれた変異体を50  $\mu$ g/mlのアンピシリン含有LB液体培地1.5mlに植菌し37℃で16時間振盪培養した後、常法に従ってプラスミドを抽出した。このプラスミドをpcmFOD1及びpcmFOD2と命名した。

#### 実施例 19

##### <変異FOD遺伝子塩基配列の決定>

実施例 18 で得られた変異FOD遺伝子についてジデオキシ法により塩基配列を決定した。その結果、2つの変異体は同じ構造を有し、配列表配列番号1の塩基配列1115のAがGに変換され、コードされる組換え変異FODのアミノ酸配列が配列表配列番号1のアミノ酸配列372番のリジンがアルギニンに変換されていることを確認した。

#### 実施例 20

##### <各種変異体の基質特異性確認>

実施例 19 で確認されたアミノ酸変異箇所について、他のアミノ酸への置換の効果を観察するためにKunkelらの部位特異的変異法を行った。配列表配列番号7記載の塩基配列の1から27までの配列を有するオリゴヌクレオチドの合成を外部に委託（BEX社）し、さらにMutant-Kキット（宝酒造社製）を使用して、添付されたマニュアルに従って部位特異変異を行った。取得した変異遺伝子は再び発現プラスミドpTV119Nに組み込み、大腸菌宿主に導入して50  $\mu$ g/mlのアンピシリンと1 mMのIPTGを含有する3.7%のBHI液体培地で30℃、16時間培養し、変異FOD蛋白を生産させた。以上のようにして得られた複数の変異体について実施例 16、17と同様の方法で基質特異性を測定したところ、アルギニン以外にトリプトファン、メチオニン、スレオニン、バリン、アラニン、セリン、システイン、グリシンに変換した変異体がアルギニンに変換した変異体と同様の糖化リジン特異的な基質特異性を有していることを確認した。この結果を表6に示す。

表 6

反応性 327位 アミノ酸	Kcat表示			Km/K <sub>o</sub> 表示		
	基質糖化アミノ酸		反応性比	基質糖化アミノ酸		反応性比
	リジン(a)	バリン(b)		リジン(a)	バリン(b)	
リジン(野生型)	14900	549	27.1	5650	596	9.5
アルギニン	351	0.45	788	447	1.00	440
トリプトファン	248	限界以下	—	319	0.11	2980
メチオニン	853	1.14	745	638	0.46	1480
バリン	1470	1.04	1420	1940	1.01	1930
スレオニン	952	0.47	2010	866	0.93	927
アラニン	1790	1.21	1480	N. D.	N. D.	N. D.
セリン	1250	1.68	747	N. D.	N. D.	N. D.
システイン	569	0.37	1560	N. D.	N. D.	N. D.
グリシン	271	0.74	365	N. D.	N. D.	N. D.

なお表中の限界以下は測定限界以下、N. D. は測定データなしを示す。これにより、配列表配列番号1のアミノ酸配列372番目のリジンを変換することによりFODの糖化リジン反応性を糖化バリン反応性に対して相対的に低下させることができることが確かめられ、特にトリプトファン、メチオニン、バリンへの変異体が高い糖化リジン特異性と良好な酵素性状を有していることが判明した。このトリプトファンへの変異体をFOD-W、FOD-Wを生産する発現プラスミドをpcmFOD3、メチオニンへの変異体をFOD-M、FOD-Mを生産する発現プラスミドをpcmFOD4、バリンへの変異体をFOD-V、FOD-Vを生産する発現プラスミドをpcmFOD5と命名した。図7に各プラスミドの共通構造を示す。

#### 実施例 2 1

<被検液中のε-フルクトシル-L-リジン (ZFL) を消去した後、フルクトシル-L-バリン (FV) の測定>

#### 反応液1

50mMのトリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)

10U/mlのFOD-V

5U/mlのカタラーゼ

## 反応液2

50mMのトリスー塩酸緩衝液 (pH7.5)

10U/mlのFOD

20U/mlのペルオキシダーゼ

0.05%のアジ化ナトリウム

0.04%の4-アミノアンチピリン

0.04%のTOOS

被検液: 0.3mMのZFL溶液に終濃度が0、0.1、0.2、0.3mMとなるようにFVを添加したもの。

0.5mlの反応液1を37℃、5分間、予備加温した後、0.05mlの上記被検液を添加して、37℃、5分間反応させ、0.5mlの反応液2を添加し、5分後に555nmにおける吸光度を測定する。ブランクには被検液の変わりに蒸留水を使用する。また対照として、反応液1のFOD-Vを添加していない反応液を用いて同様に操作した。

図8の白丸はFOD-V無添加を、白四角はFOD-Vを添加した場合の測定値をそれぞれ示す。

FOD-VおよびFODを用いることにより図8から明らかなように、FOD-Vにより、被検液中のZFLを消去した後に、FVを定量的に測定することができた。

なお、配列表配列番号1のアミノ酸配列372番目のリジンをトリプトファン、メチオニン及びバリンに変換した配列をそれぞれ配列表配列番号2、3及び4に示す。

## 実施例22

### <糖化アルブミン割合の測定>

#### R-1 蛋白質分解試薬

50mM	POPSO酸緩衝液 (和光純薬社製) pH7.5
2500U/ml	プロテアーゼタイプXXIV (シグマ社製)
1%	硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパン (シグマ社製)
5U/ml	アスコルビン酸オキシダーゼ (ロシュ社製)
5%	DMSO
5mM	4-アミノアンチピリン



## R-2 糖化アミノ酸測定試薬

150mM	HEPES酸緩衝液（和光純薬社製） pH7.5
5mM	TODB
10U/ml	POD
20U/ml	R-FOD-II
3%	グルタミン酸

## R-3 アルブミン前処理試薬

10mM	Tris-HCl緩衝液 pH8.0
0.3%	ラウリル硫酸ナトリウム

## R-4 アルブミン発色試薬

200mM	コハク酸緩衝液（和光純薬社製） pH5.5
0.15mM	ブロモクレゾールパープル（和光純薬社製）
0.3%	Tx-100（和光純薬社製）

## &lt;試料&gt;

1：健常者及び糖尿病患者血清各35検体

2：キャリブレーターは管理血清H（ビー・エム・エル社製）を用いた。

キャリブレーターのグリコアルブミン濃度は臨床検体のHPLC法測定値と酵素法の測定値が一致するようにあらかじめ設定した。アルブミン値はCRM 470の値を移した。

## &lt;反応手順&gt;

37℃にインキュベートされたR-1;240  $\mu$ lに試料8  $\mu$ lを添加し、37℃で反応を開始し、正確に5分後にR-2;80  $\mu$ lを添加した。R-2添加前及び添加5分後の555nmの吸光度変化を測定した。別途管理血清H、蒸留水を測定し検量線を作成し、検体中の糖化アルブミン濃度を算出した。

一方37℃にインキュベートされたR-3;アルブミン前処理試薬;160  $\mu$ lに試料2  $\mu$ lを添加し、37℃で反応を開始し、正確に5分後にR-4;アルブミン発色試薬;160  $\mu$ lを添加した。アルブミン発色試薬添加前及び添加5分後の600nmの吸光度を測定した。また試料の代わりに蒸留水及びアルブミン濃度が既知である試料から検量線を作成しアルブミン測定値を求めた。

酵素法によるGA%は $GA\% = GA\text{濃度} / \text{アルブミン濃度} \times 100$ より求めた。またHPLC法測定値はハイオートジー・エイ・エイ2000（アークレイ社製）を用いて測定した。

結果を図 9 に示す。

図 9 から分かるように酵素法とHPLC法は $r=0.998$ と非常に良い相関を示した。また本試薬全てを液状で $37^{\circ}\text{C}$ -2週間保存しても性能に変化はなかった。このことから1) グロブリン成分及びアスコルビン酸の影響回避、2) プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化、3) 正確にアルブミンを測定、4) 糖化ヘモグロビンの影響回避を行うことにより正確に糖化アルブミンを測定していること及び糖化アルブミン割合を測定していることが明らかであった。

### <実施例 2 3>

<第 1 試薬に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素、第 2 試薬にプロテアーゼを含有する組成物>

R-1

200mM	POPSO 緩衝液 pH7.5
5mM	4 - アミノアンチピリン
10 U/ml	POD
20 U/ml	R - FOD
5 U/ml	アスコルビン酸オキシダーゼ
3%	グルタミン酸

R-2

20mM	ピペラジン-1, 4-ビス(2-エタンスルホン酸)緩衝液 pH6.5
20%	DMSO
8000 U/ml	プロテアーゼタイプ XXIV
4%	硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2 ハイ ドロキシ-1-プロパン
5 mM	TODB

R-3, 4 実施例 2 2 に同じ

<試料>実施例 2 2 に同じ試料及び  $10 - 200 \mu\text{M}$  の F Z L

<反応手順>実施例 2 2 に同じ

結果を図 2 3 に示す。

図 2 3 から分かるように第 1 試薬に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素、第 2 試薬にプロテアーゼを処方した場合にも反応時間 10 分という短い時間で良好に糖化蛋白質が測定できており、また試料中に糖化アミノ酸が存在した場合に

も、R-1に処方されている少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素により糖化アミノ酸が消去されてより正確に糖化蛋白質が測定できることが明白である。

また本試薬とHPLC法との相関は、

酵素法GA% =  $1.03 * \text{HPLC法GA\%} - 0.3$   $R = 0.99$ と良好な相関を示し、正確に糖化蛋白質が測定されていることも明らかであった。さらに本試薬は液状で37℃-3週間若しくは冷蔵15ヶ月保存しても性能の低下はなかった。

#### [産業上の利用の可能性]

本発明により、より正確に被検体中の糖化蛋白質及び糖化アルブミン割合を測定することが可能になった。したがって、臨床検査薬として有用に利用することができる。

#### [寄託生物材料への言及]

- (1) イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 (郵便番号305-8566)

- ロ イの機関に寄託について付した日付(原寄託日)

平成13年1月16日

- ハ イの機関に寄託について付した受託番号

FERM BP- 7847

- (2) イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 (郵便番号305-8566)

- ロ イの機関に寄託について付した日付(原寄託日)

平成13年1月16日

- ハ イの機関に寄託について付した受託番号

FERM BP- 7848

## 請 求 の 範 囲

1. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する組成物において、プロテアーゼと

1) デオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、コール酸アミド、オクチルグルコシド、第四級アンモニウム塩、第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤、コンカナバリンA若しくはベタインのなかから選択される1種以上、及び/または

2) アスコルビン酸オキシダーゼ及び4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たない緩衝剤、を共存させることを特徴とする糖化蛋白質を測定するための組成物。

2. デオキシコール酸アミドがビスグルコナミドプロピルデオキシコーラミドであり、コール酸アミドが硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン、硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパン若しくはビスグルコナミドプロピルコーラミドである請求の範囲第1項に記載の組成物。

3. 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たない緩衝剤がトリスヒドロキシエチルアミノメタン若しくはピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)である請求の範囲第1項に記載の組成物。

4. 糖化蛋白質が糖化アルブミンであり、別途アルブミンを測定する組成物を含み、アルブミンに対する糖化アルブミンの糖化割合を測定する組成物において、アルブミン測定用組成物が、蛋白質変性剤及び/またはS-S結合を有する化合物及びブロムクレゾールパープルを含有する請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の組成物。

5. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化アルブミンを測定し、別途アルブミンを測定しアルブミンに対する糖化アルブミンの糖化割合を算出するための組成物において、アルブミン測定用組成物が、蛋白質変性剤及び/または、S-S結合を有する化合物及びブロムクレゾールパープルを含有することを特徴とする組成物。

6. 蛋白質変性剤及び/またはS-S結合を有する化合物が、2,2'-ジチオサリチル酸(2,2'-dithiodibenzoicacid)、4,4'-ジチオジモルホリン(4,4'-di

thiodimorpholine)、2,2'-ジヒドロキシ-6,6'-ジナフチルジスルフィド(2,2'-dihydroxy-6,6'-dinaphthyl disulfide; DDD)、2,2'-ジチオジピリジン(2,2'-dithiopyridine; 2-PDS)、4,4'-ジチオジピリジン(4,4'-dithiopyridine; 4-PDS)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); DTNB)若しくはラウリル硫酸ナトリウムである請求の範囲第4項または第5項に記載の組成物。

7. プロテアーゼにジメチルスルホキシド、アルコール、水溶性カルシウム塩、食塩、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤より選ばれるプロテアーゼ安定化剤を添加する請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の組成物。

8. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する組成物であって、ジメチルスルホキシド、アルコール、水溶性カルシウム塩、食塩、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤より選ばれるプロテアーゼ安定化剤を含有することを特徴とする糖化蛋白質を測定するための組成物。

9. 少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素に糖アルコール、スクロース、水溶性マグネシウム塩、水溶性カルシウム塩、硫酸、アミノ酸、ザルコシンより選ばれる少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤を添加する請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の組成物。

10. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する組成物であって、糖アルコール、スクロース、水溶性マグネシウム塩、水溶性カルシウム塩、硫酸、アミノ酸、ザルコシンより選ばれる少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤を含有することを特徴とする糖化蛋白質を測定するための組成物。

11. プロテアーゼがバチルス属由来のプロテアーゼである請求の範囲第1～10項のいずれかに記載の組成物。

12. 少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素が配列表配列番号1のアミノ酸配列の372番目のリジンを他のアミノ酸に置換することにより糖化バリン反応性を著しく低下させた変異型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼである請求の範囲第1～11項のいずれかに記載の組成物。

13. 他のアミノ酸としてトリプトファン、メチオニン若しくはバリンに置

換された変異型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いる請求の範囲第12項に記載の組成物。

14. 組成物が液状品である請求の範囲第1～13項のいずれかに記載の組成物。

15. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する組成物であって、第1試薬に少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素、第2試薬にプロテアーゼを含有することを特徴とする組成物。

16. 組成物が液状品である請求の範囲第15項に記載の組成物。

17. 配列表配列番号1のアミノ酸配列の372番目のリジンを他のアミノ酸に置換することにより糖化バリン反応性を著しく低下させた変異型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

18. 他のアミノ酸がトリプトファン、メチオニン若しくはバリンである請求の範囲第17項に記載の変異型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

19. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する方法において、プロテアーゼ反応時に、

1) デオキシコール酸、デオキシコール酸アミド、コール酸アミド、第四級アンモニウム塩、第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤、コンカナバリンA、オクチルグルコシド若しくはベタインから選択される1種以上を共存させることにより、プロテアーゼのグロブリン成分への作用を低下し、

及び／若しくは

2) アスコルビン酸オキシダーゼを4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たない緩衝剤中で作用させ、アスコルビン酸の消去及び蛋白質の断片化を同時に行い、

糖化蛋白質を測定する方法。

20. デオキシコール酸アミドがビスグルコナミドプロピルデオキシコーラミドであり、コール酸アミドが、硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン、硫酸-3-[(コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパン若しくはビスグルコナミドプロピルコーラミドである請求の範囲第19項に記載の方法。

21. 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル基を持たない緩衝剤がトリスヒドロキシエチルアミノメタン若しくはピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-

3-プロパンスルホン酸)である請求の範囲第19項に記載の方法。

22. 糖化蛋白質がアルブミンであり、別途アルブミンを測定し、アルブミンに対する糖化アルブミンの糖化割合を算出する糖化アルブミン測定方法において、アルブミン測定のさい、被検液を、蛋白質変性剤及び／またはS-S結合を有する化合物にて前処理を行い、同時若しくは続いてブロモクレゾールパープルを用いてアルブミンを測定する請求の範囲第19～21項のいずれかに記載の方法。

23. 被検液に、プロテアーゼを作用させアルブミンの断片化を行い、次いで少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化アルブミンを測定し、この値を別途ブロモクレゾールパープルを用い測定したアルブミンで除しアルブミンに対する糖化アルブミン割合を算出する方法において、蛋白質変性剤又は／及びS-S結合を有する化合物にて前処理を行い、同時若しくは続いてアルブミンを測定することを特徴とする方法。

24. 蛋白質変性剤又は／及びS-S結合を有する化合物が、2,2'-ジチオサリチル酸(2,2'-dithiodibenzoic acid)、4,4'-ジチオジモルホリン(4,4'-dithiodimorpholine)、2,2'-ジヒドロキシ-6,6'-ジナフチルジスルフィド(2,2'-dihydroxy-6,6'-dinaphthyl disulfide; DDD)、2,2'-ジチオジピリジン(2,2'-dithiopyridine; 2-PDS)、4,4'-ジチオジピリジン(4,4'-dithiopyridine; 4-PDS)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); DTNB)若しくはラウリル硫酸ナトリウムである請求の範囲第22項または第23項に記載の方法。

25. プロテアーゼにジメチルスルホキシド、アルコール、水溶性カルシウム塩、食塩、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤より選ばれるプロテアーゼ安定化剤を添加する請求の範囲第19～23項のいずれかに記載の方法。

26. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する方法に於いて、プロテアーゼにジメチルスルホキシド、アルコール、水溶性カルシウム塩、食塩、第四級アンモニウム塩若しくは第四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤より選ばれるプロテアーゼ安定化剤を添加することを特徴とする、糖化蛋白質を測定する方法。

27. 少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素に、糖アルコール、スクロー

ス、水溶性マグネシウム塩、水溶性カルシウム塩、硫酸、アミノ酸、ザルコシンより選ばれる安定化剤を添加する請求の範囲第19～26項のいずれかに記載の方法。

28. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する方法に於いて、少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素に糖アルコール、スクロース、水溶性マグネシウム塩、水溶性カルシウム塩、硫酸、アミノ酸、ザルコシンより選ばれる糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤を添加することを特徴とする、糖化蛋白質を測定する方法。

29. プロテアーゼがバチルス属由来のプロテアーゼである請求の範囲第19～28項のいずれかに記載の方法。

30. 少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素が配列表配列番号1のアミノ酸配列372番目のリジンを他のアミノ酸に置換することにより糖化バリン反応性を著しく低下させた変異型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼである請求の範囲第19～29項のいずれかに記載の方法。

31. 他のアミノ酸としてトリプトファン、メチオニン若しくはバリンを用いて置換した変異型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いる請求の範囲第30項に記載の方法。

32. 組成物が液状品である請求の範囲第19～31項のいずれかに記載の方法。

33. 試料に、少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素、次いでプロテアーゼを作用させ、糖化蛋白質を測定する請求の範囲第32項に記載の方法。

34. プロテアーゼ及び少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する方法において、少なくとも糖化アミノ酸に作用する酵素、次いでプロテアーゼを作用させることを特徴とする糖化蛋白質を測定する方法。



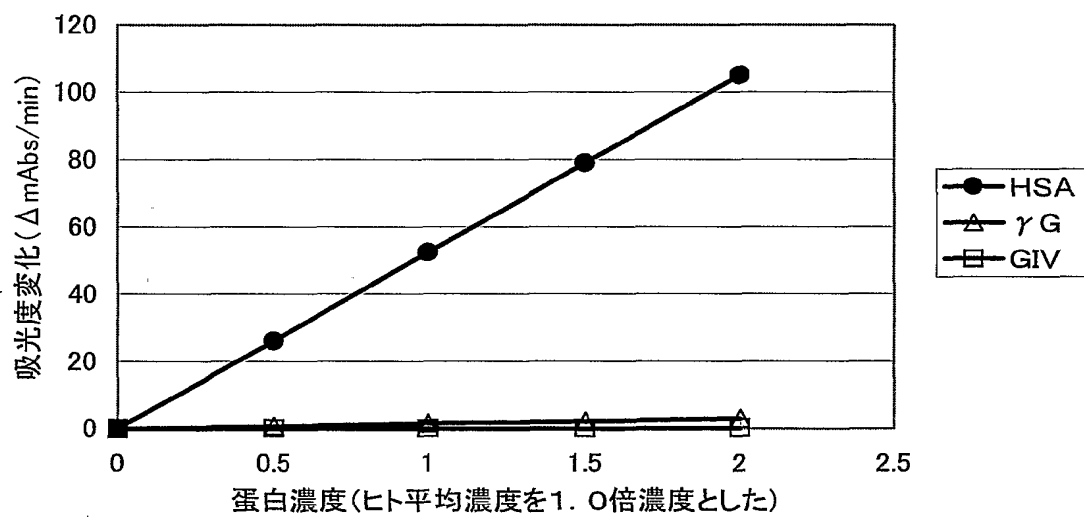


図 1

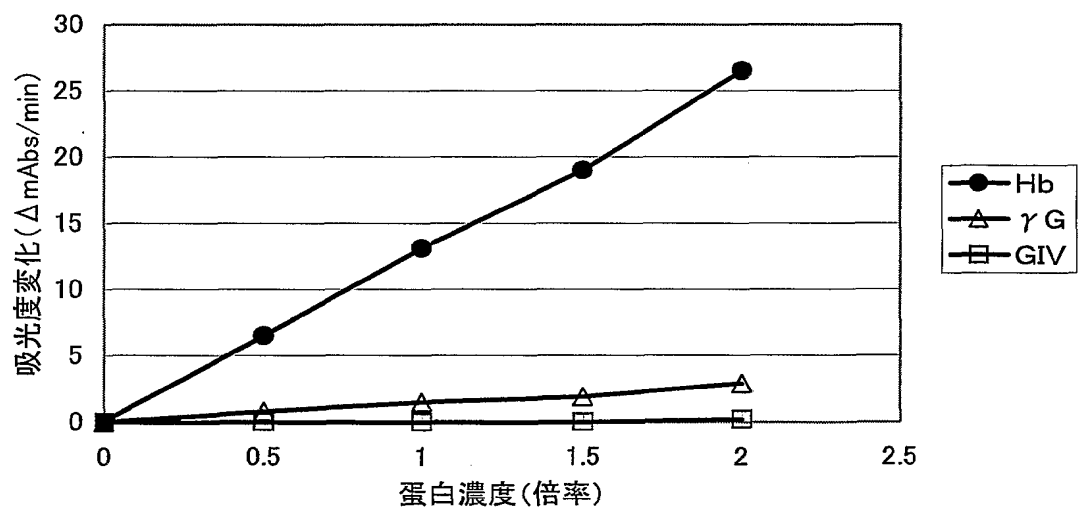


図 2

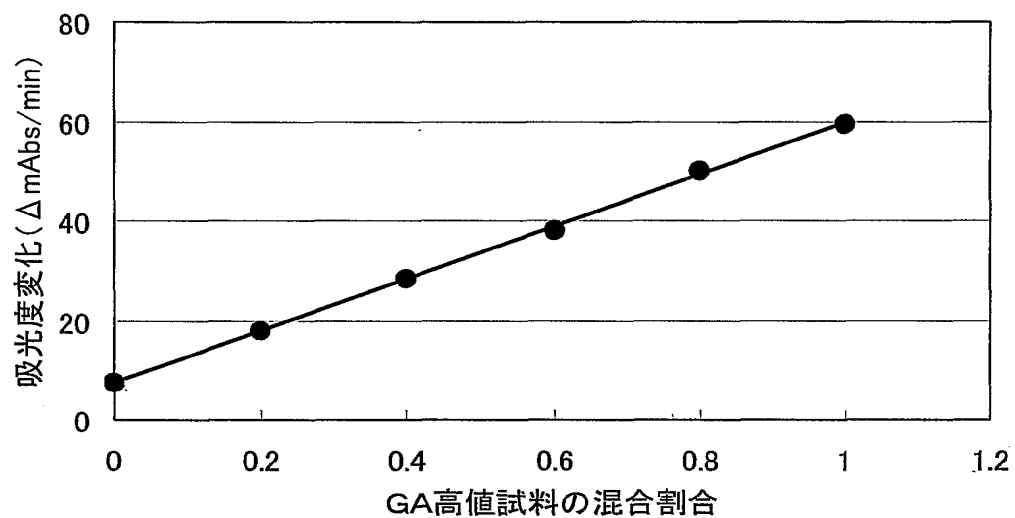


図3 GA測定に於ける直線性

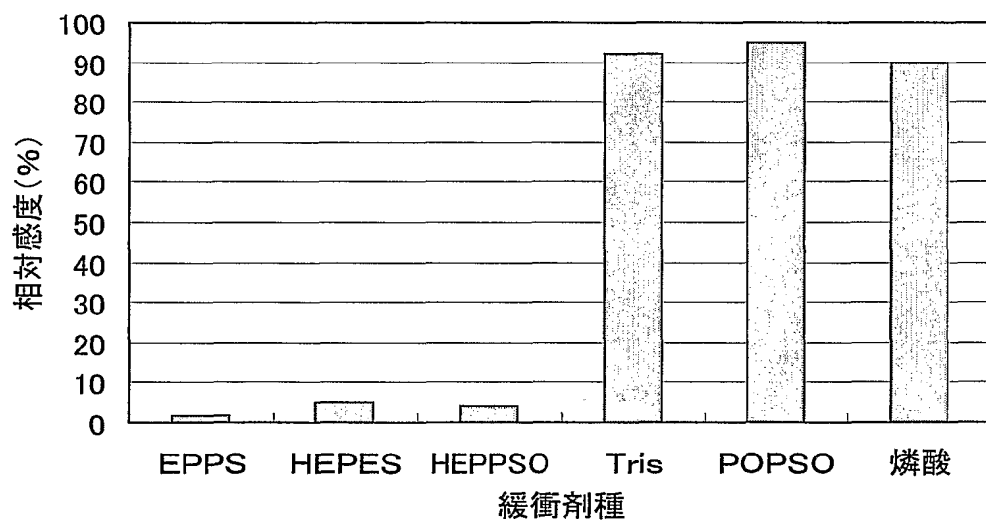


図4 アスコルビン酸消去能安定性に於ける緩衝剤種類の効果

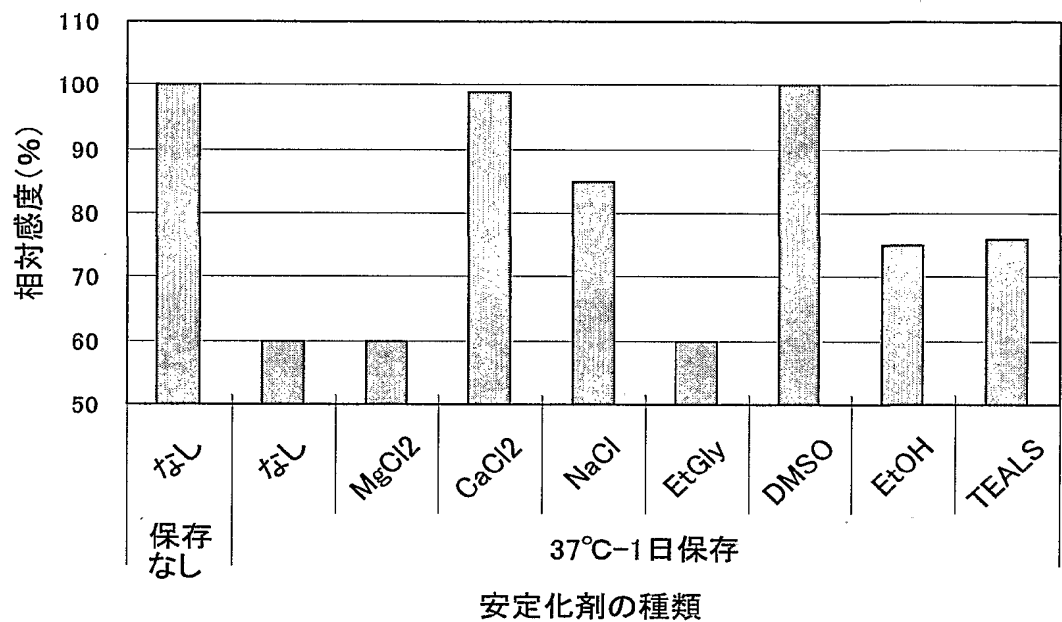


図5 前処理試薬の保存安定性と安定剤の効果

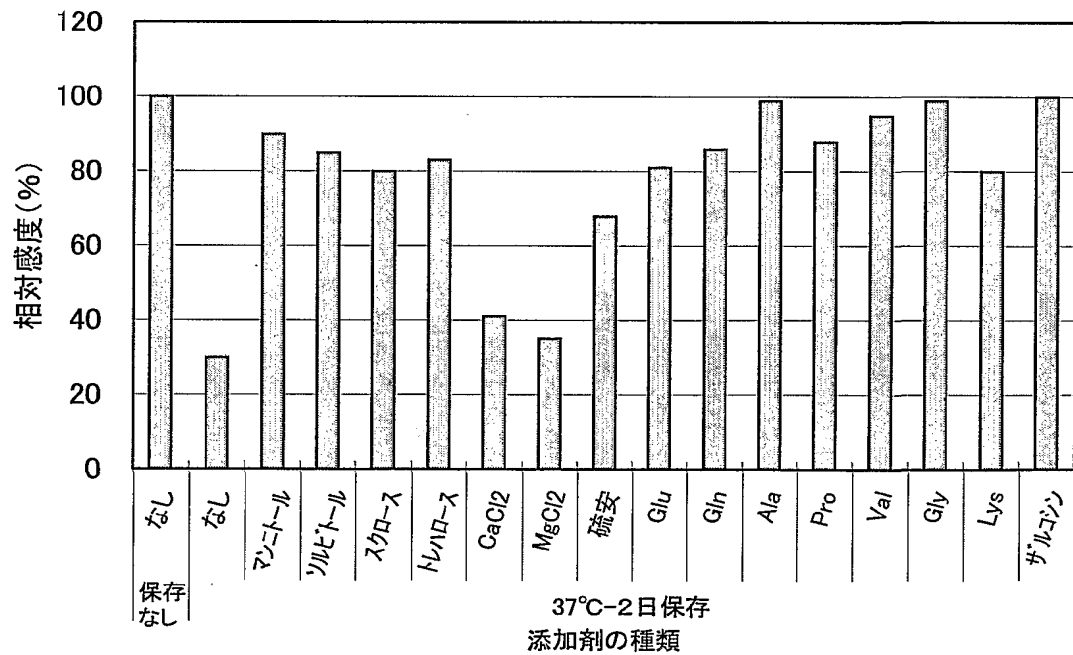


図6 糖化アミン酸安定試薬の安定化

差 替 え 用 紙 (規則26)

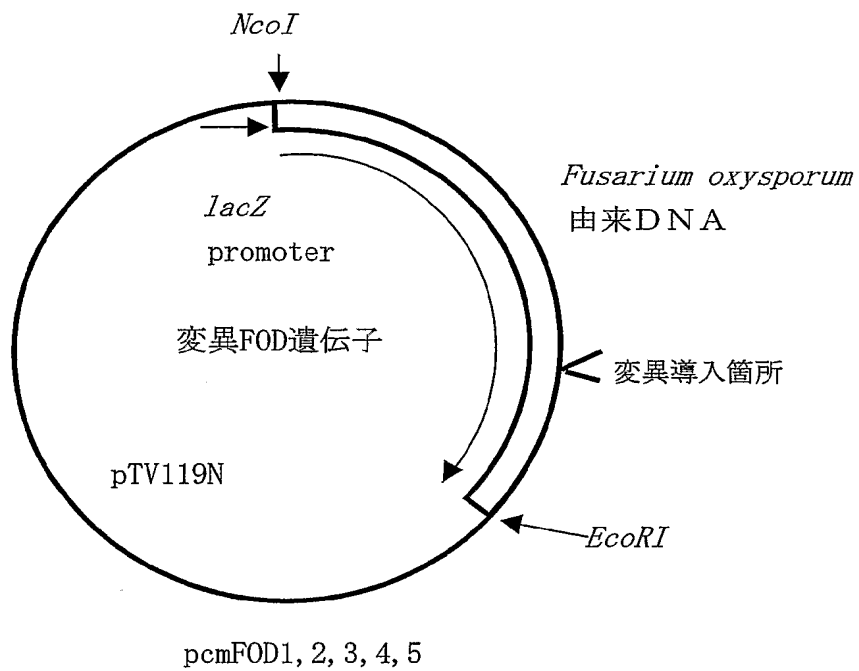


図 7

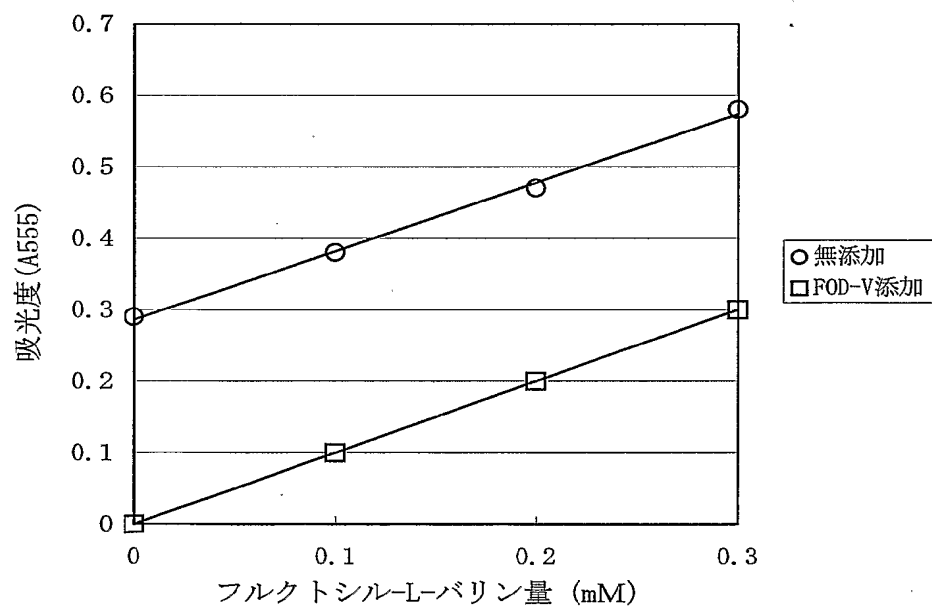


図 8

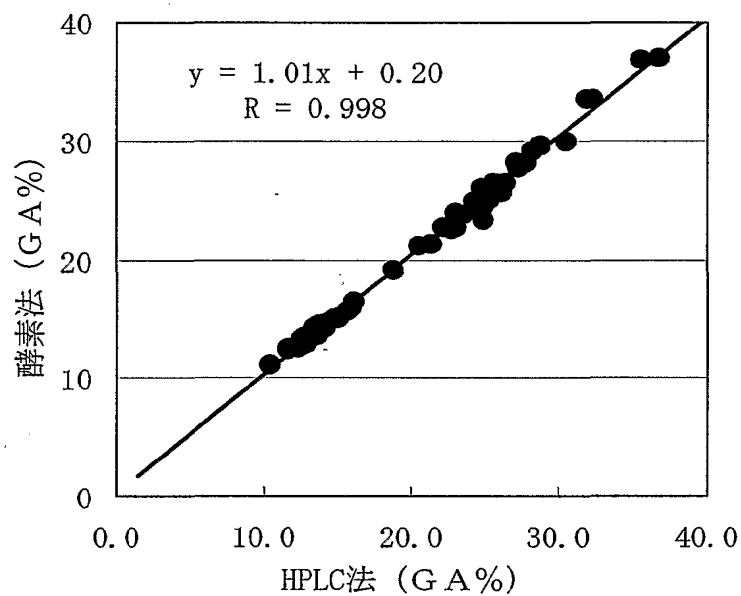


図9 HPLC法と酵素法の相関

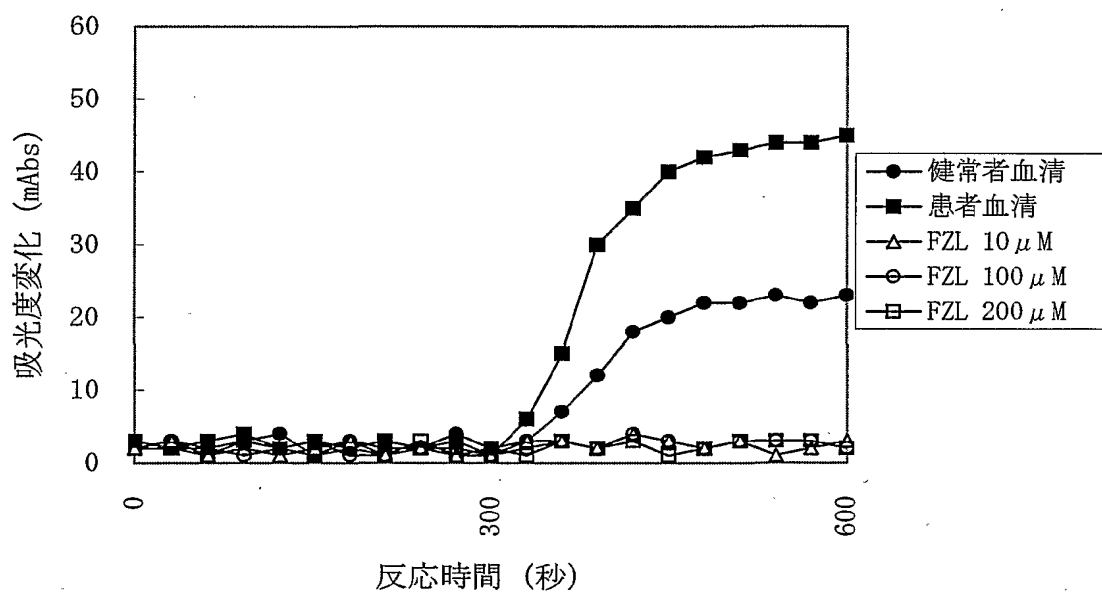


図10 プロテアーゼを第2試薬添加した組成物の反応曲線

SEQUENCE LISTING

<110>Yoshioka, Issei; Asahi Kasei Co., Ltd

<120> The composition to determine glycosilated protein

<130>

<150> JP 2001/ 22953

JP 2001/ 39796

JP 2001/ 24002

<151> 2001- 1-13

2001- 2-16

2001- 8- 8

<160>7

<170>

<210>1

<211>1320

<212>DNA

<213>Fusarium oxysporum IFO-9722

<220>

<221>CDS

<222>(1)... (1320)

<300>

<308>DDBJ E16562

<309>1999-07-28

<310>JP 1998201473-A/1

&lt;311&gt;1997-01-20

&lt;312&gt;1998-08-04

&lt;400&gt;1

```

gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga      48
Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
   1             5             10             15
act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc      96
Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
           20           25           30
aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc      144
Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
           35           40           45
ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc      192
Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
           50           55           60
aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca      240
Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
           65           70           75           80
gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat      288
Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
           85           90           95
aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg      336
Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
           100          105          110
gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac      384
Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
           115          120          125
aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt      432
Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
           130          135          140

```

```

aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg      480
Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
145                      150                      155                      160
ggt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg      528
Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
                      165                      170                      175
ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt      576
Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser
                      180                      185                      190
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt      624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly
                      195                      200                      205
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca      672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala
                      210                      215                      220
gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc      720
Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr
225                      230                      235                      240
ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac      768
Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn
                      245                      250                      255
ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat      816
Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp
                      260                      265                      270
gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc      864
Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys
                      275                      280                      285
aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc      912
Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe
                      290                      295                      300
gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt      960

```



Ala	Lys	His	Gln	Val	Pro	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Arg	Met	Lys	Gln	Phe	
305					310					315					320	
ctg	aaa	gat	atc	atg	cct	cag	ctt	gca	gat	cgg	ccg	ctt	gtt	cat	gct	1008
Leu	Lys	Asp	Ile	Met	Pro	Gln	Leu	Ala	Asp	Arg	Pro	Leu	Val	His	Ala	
				325					330					335		
cga	atc	tgc	tgg	tgc	gct	gat	aca	cag	gat	aga	atg	ttc	ctg	atc	acc	1056
Arg	Ile	Cys	Trp	Cys	Ala	Asp	Thr	Gln	Asp	Arg	Met	Phe	Leu	Ile	Thr	
				340					345					350		
tat	cat	cct	cga	cat	ccc	tca	ctt	gtc	att	gct	tca	ggt	gat	tgc	ggc	1104
Tyr	His	Pro	Arg	His	Pro	Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Ser	Gly	Asp	Cys	Gly	
				355					360					365		
acg	ggt	tac	aag	cat	atc	aca	tca	att	gga	aag	ttc	atc	tct	gac	tgt	1152
Thr	Gly	Tyr	Lys	His	Ile	Thr	Ser	Ile	Gly	Lys	Phe	Ile	Ser	Asp	Cys	
				370					375					380		
atg	gag	ggt	acg	ctt	gag	gaa	agg	ttt	gcc	aag	ttc	tgg	aga	tgg	cga	1200
Met	Glu	Gly	Thr	Leu	Glu	Glu	Arg	Phe	Ala	Lys	Tyr	Trp	Arg	Trp	Arg	
385					390					395					400	
cca	gag	aag	ttt	acc	gag	ttc	tgg	ggt	aaa	gat	cct	ctg	gat	cgg	ttt	1248
Pro	Glu	Lys	Phe	Thr	Glu	Phe	Trp	Gly	Lys	Asp	Pro	Leu	Asp	Arg	Phe	
				405					410					415		
gga	gct	gac	gat	aag	atc	atg	gat	ttg	ccc	aag	agt	gat	gta	gag	gga	1296
Gly	Ala	Asp	Asp	Lys	Ile	Met	Asp	Leu	Pro	Lys	Ser	Asp	Val	Glu	Gly	
				420					425					430		
tgg	aca	aat	atc	aag	aat	gat	atc									1320
Trp	Thr	Asn	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile									
				435					440							

 $\langle 210 \rangle_2$  $\langle 211 \rangle 1320$ 

<212>DNA

### <213>Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;CDS

&lt;222&gt;(1)... (1320)

&lt;221&gt;mutation

&lt;222&gt;(1114)... (1115)

&lt;221&gt;MUTAGEN

&lt;222&gt;(372)

&lt;400&gt;2

```

gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga      48
Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
   1             5             10             15
act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc      96
Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
           20           25           30
aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc      144
Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
           35           40           45
ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc      192
Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
           50           55           60
aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca      240
Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
           65           70           75           80
gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat      288
Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
           85           90           95
aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg      336

```

Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu	
100 105 110	
gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac	384
Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn	
115 120 125	
aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt	432
Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly	
130 135 140	
aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg	480
Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp	
145 150 155 160	
gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg	528
Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg	
165 170 175	
ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt	576
Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser	
180 185 190	
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt	624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly	
195 200 205	
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca	672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala	
210 215 220	
gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc	720
Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr	
225 230 235 240	
ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac	768
Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn	
245 250 255	
ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat	816
Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp	

260	265	270	
gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc			864
Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys			
275	280	285	
aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc			912
Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe			
290	295	300	
gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt			960
Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe			
305	310	315	320
ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct			1008
Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala			
	325	330	335
cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc			1056
Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr			
340	345	350	
tat cat cct cga cat ccc tca ctt gtc att gct tca ggt gat tgc ggc			1104
Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly			
355	360	365	
acg ggt tac ttg cat atc aca tca att gga aag ttc atc tct gac tgt			1152
Thr Gly Tyr Trp His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys			
370	375	380	
atg gag ggt acg ctt gag gaa agg ttt gcc aag ttc tgg aga tgg cga			1200
Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg			
385	390	395	400
cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt			1248
Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe			
405	410	415	
gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga			1296
Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly			
420	425	430	

tgg aca aat atc aag aat gat atc 1320  
 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile  
 435 440

<210>3

<211>1320

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>CDS

<222>(1)... (1320)

<221>mutation

<222>(1115)

<221>MUTAGEN

<222>(372)

<400>3

gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga 48  
 Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly  
 1 5 10 15  
 act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc 96  
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr  
 20 25 30  
 aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc 144  
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala  
 35 40 45  
 ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc 192  
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser

50	55	60	
aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca			240
Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala			
65	70	75	80
gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat			288
Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn			
	85	90	95
aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg			336
Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu			
	100	105	110
gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac			384
Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn			
	115	120	125
aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt			432
Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly			
	130	135	140
aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg			480
Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp			
145	150	155	160
gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg			528
Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg			
	165	170	175
ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt			576
Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser			
	180	185	190
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt			624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly			
	195	200	205
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca			672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala			
210	215	220	

10

Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg  
 385                                      390                                      395                                      400  
 cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt 1248  
 Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe  
                                          405                                      410                                      415  
 gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga 1296  
 Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly  
                                          420                                      425                                      430  
 tgg aca aat atc aag aat gat atc 1320  
 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile  
                                          435                                      440

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;1320

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;CDS

&lt;222&gt;(1)... (1320)

&lt;221&gt;mutation

&lt;222&gt;(1114)... (1115)

&lt;221&gt;MUTAGEN

&lt;222&gt;(372)

&lt;400&gt;4

gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga 48  
 Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly  
                                          1                                      5                                      10                                      15



act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc 96  
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr  
 20 25 30  
 aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc 144  
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala  
 35 40 45  
 ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc 192  
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser  
 50 55 60  
 aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca 240  
 Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala  
 65 70 75 80  
 gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat 288  
 Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn  
 85 90 95  
 aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg 336  
 Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu  
 100 105 110  
 gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac 384  
 Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn  
 115 120 125  
 aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt 432  
 Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly  
 130 135 140  
 aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg 480  
 Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp  
 145 150 155 160  
 gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg 528  
 Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg  
 165 170 175  
 ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt 576

Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser	
180	185
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt	624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly	
195	200
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca	672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala	
210	215
gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc	720
Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr	
225	230
ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac	768
Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn	
245	250
ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat	816
Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp	
260	265
gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc	864
Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys	
275	280
aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc	912
Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe	
290	295
gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt	960
Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe	
305	310
ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct	1008
Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala	
325	330
cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc	1056
Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr	

340	345	350	
tat cat cct cga cat ccc tca ctt gtc att gct tca ggt gat tgc ggc	1104		
Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly			
355	360	365	
acg ggt tac gtg cat atc aca tca att gga aag ttc atc tct gac tgt	1152		
Thr Gly Tyr Val His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys			
370	375	380	
atg gag ggt acg ctt gag gaa agg ttt gcc aag ttc tgg aga tgg cga	1200		
Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg			
385	390	395	400
cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt	1248		
Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe			
405	410	415	
gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga	1296		
Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly			
420	425	430	
tgg aca aat atc aag aat gat atc			1320
Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile			
435	440		

&lt;210&gt; 5'

&lt;211&gt;30

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;PCR primer

&lt;400&gt;5

aaaaccatgg cctcaactct caccaaacag

30

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>PCR primer

<400>6

aaaaagaatt cagatatcat tcttgatatt

30

<210>7

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Site directed mutagenesis primer

<400>7

ggcacgggtt acnscatat cacatca

27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00721

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/26, C12Q1/37, C12N15/09, G01N33/68, G01N33/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/26, C12Q1/37, C12N15/09, G01N33/68, G01N33/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2001-054398 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 27 February, 2001 (27.02.01), (Family: none)	1-34
P, A	JP 2001-215229 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 10 August, 2001 (10.08.01), (Family: none)	1-34
X	JP 10-232233 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 02 September, 1998 (02.09.98), (Family: none)	5, 6, 23, 24
P, A	JP 2001-258593 A (Oriental Yeast Co., Ltd.), 25 September, 2001 (25.09.01), & WO 01/71024 A	5, 23
X	JP 2000-342252 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 12 December, 2000 (12.12.00), (Family: none)	8, 25, 26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
09 April, 2002 (09.04.02)

Date of mailing of the international search report  
23 April, 2002 (23.04.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00721

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-243950 A (KDK Corp.), 14 September 1999 (14.09.99), & EP 678576 A & US 5789221 A	9, 10, 27, 28
A	JP 10-201473 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 04 August, 1998 (04.08.98), (Family: none)	12, 13, 17, 18, 30, 31
X	JP 11-155596 A (KDK Corp.), 15 June, 1999 (15.06.99), & EP 919632 A & US 5985591 A	15, 16, 34

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00721

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims consist of the following groups of inventions:

- (1) claims 1-4, 6, 7, 9, 11-14, 19-22, 24, 25, 27 and 29-33;
- (2) claims 5-7, 9, 11-14, 23-25, 27 and 29-33;
- (3) claims 8, 9, 11-14, 26, 27 and 29-33;
- (4) claims 10-14 and 28-33;
- (5) claims 15, 16 and 34;
- (6) claims 17 and 18.

Since compositions for assaying a glycoprotein by using proteases and enzymes acting on glycoamino acids had been publicly known, there is no special technical feature common to the above groups of inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12Q1/26, C12Q1/37, C12N15/09, G01N33/68, G01N33/72		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12Q1/26, C12Q1/37, C12N15/09, G01N33/68, G01N33/72		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	JP 2001-054398 A (旭化成工業株式会社) 2001.02.27 ファミリーなし	1-34
PA	JP 2001-215229 A (和光純薬工業株式会社) 2001.08.10 ファミリーなし	1-34
X	JP 10-232233 A (和光純薬工業株式会社) 1998.09.02 ファミリーなし	5, 6, 23, 24
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 09.04.02	国際調査報告の発送日 23.04.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一	4B 9162
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	JP 2001-258593 A (オリエンタル酵母工業株式会社) 2001. 09. 25 & WO 01/71024 A	5, 23
X	JP 2000-342252 A (第一化学薬品株式会社) 2000. 12. 12 ファミリーなし	8, 25, 26
A	JP 11-243950 A (株式会社京都第一科学) 1999. 09. 14 & EP 678576 A & US 5789221 A	9, 10, 27, 28
A	JP 10-201473 A (旭化成工業株式会社) 1998. 08. 04 ファミリーなし	12, 13, 17, 18, 30, 31
X	JP 11-155596 A (株式会社京都第一科学) 1999. 06. 15 & EP 919632 A & US 5985591 A	15, 16, 34

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲は、次の発明群からなる。

- (1) 請求の範囲1-4, 6, 7, 9, 11-14, 19-22, 24, 25, 27, 29-33
- (2) 請求の範囲5-7, 9, 11-14, 23-25, 27, 29-33
- (3) 請求の範囲8, 9, 11-14, 26, 27, 29-33
- (4) 請求の範囲10-14, 28-33
- (5) 請求の範囲15, 16, 34
- (6) 請求の範囲17, 18

プロテアーゼ及び糖化アミノ酸に作用する酵素を用いて糖化蛋白質を測定する組成物は公知であるから、上記発明群に共通する特別な技術的特徴は存在しない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。